

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA ROPELATTO

ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
HETERORAMNANAS SULFATADAS E SEUS PRODUTOS DE
DEGRADAÇÃO PARCIAL OBTIDOS DA MACROALGA VERDE
Gayralia oxysperma

CURITIBA
2011

JULIANA ROPELATTO

ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
HETERORAMNANAS SULFATADAS E SEUS PRODUTOS DE
DEGRADAÇÃO PARCIAL OBTIDOS DA MACROALGA VERDE
Gayralia oxysperma

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Eugênia Duarte Nosedá

Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Sheila Maria B. Winnischofer

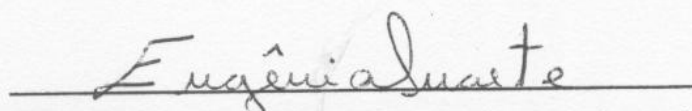
CURITIBA
2011

TERMO DE APROVAÇÃO

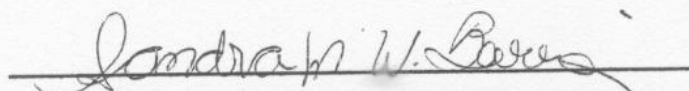
JULIANA ROPELATTO

ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE HETERORAMNANAS
SULFATADAS E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO PARCIAL OBTIDOS DA
MACROALGA VERDE *Gayralia oxysperma*

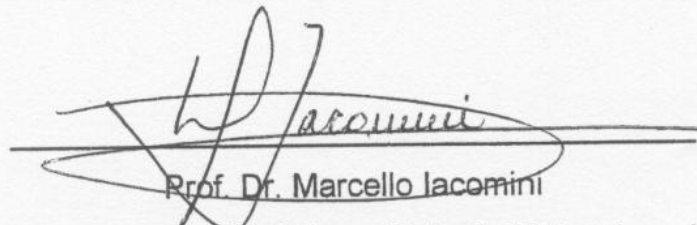
Dissertação aprovada como requisito final para a obtenção do título de Mestre no
Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica do Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal
do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof.^a Dr.^a Maria Eugênia Duarte Nosedá (orientadora)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof.^a Dr.^a Sandra Mara Woranovicz Barreira
Departamento de Farmácia – UFPR



Prof. Dr. Marcello Iacomini
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Curitiba, 24 de fevereiro de 2011.

Dedico este trabalho a quem sempre esteve ao meu lado, meu amigo, meu amor, minha vida, meu futuro marido Evandro.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da existência, pelas oportunidades oferecidas e força nos momentos difíceis.

À Prof.^a Maria Eugênia e ao Prof. Miguel pela oportunidade de orientação, por todo o conhecimento transmitido nesses dois anos, pelo apoio, confiança e paciência.

À Prof.^a Sheila pelos ensinamentos referentes à atividade biológica, pelo carinho e atenção.

Ao meu namorado Evandro, pelo companheirismo, amor, paciência, compreensão e principalmente pela força e motivação. Agradeço pelos momentos felizes a seu lado, te amo demais!!!

Aos meus pais amados, aos quais devo tudo o que sou. Obrigada pelo amor, carinho e por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus irmãos Dézinho (lindão), Cássia e Daniel, pela confiança e incentivo. Amo vocês!

Às amigas nutris: Alê, Dri, Greyce, Vê Ramos, pelo incentivo, apoio e carinho.

À Lu e Fran, por toda a ajuda desde o começo, pelos ensinamentos repassados, por toda a boa vontade em ajudar, pelo apoio, pelas conversas e risadas.

À Taline, companheira desde a graduação, agradeço pelo incentivo para tentar o mestrado e pela companhia por mais dois anos.

À Sili, vizinha de bancada, pelo convívio agradável, pelas conversas e risadas.

E ao pessoal do lab: Tati, Luciano, Gilda, Pauline, Louise, Jenifer e os ICs: André Ester e Andressa. Agradeço pela experiência compartilhada, pelas conversas e momentos de descontração.

Ao pessoal do cultivo celular, pela colaboração e paciência, especialmente Hudson, Ju Kenski e Gisele, por toda ajuda desde o início e até agora no final com as análises no citômetro.

À Prof.^a Dr.^a Franciane Pellizzari pelas algas gentilmente cedidas.

À Prof.^a Mari Cleide Sogayar pelas linhagens celulares cedidas.

Ao Prof. Miguel, Prof. Guilherme, Prof. Diogo e Luciana pela disponibilidade em realizar as análises de RMN.

À Elisângela pelas análises de HPSEC e pelas conversas.

À Rosane pelas análises de GC-MS e pela paciência.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, representada pelo Prof. Miguel Daniel Nosedá, e a todos os professores do Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular pelo estímulo.

Ao programa REUNI, a CAPES e ao PRONEX-Carboidratos pelo apoio financeiro.

Ao projeto: Polissacarídeos sulfatados de organismos marinhos – efeitos na trombose, tumorigênese e infecção viral (CNPq – Processo 558044/2009-3).

E a todas as pessoas que me ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho: meu muito obrigada!!!!

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.”

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

Algas verdes (Chlorophyta) sintetizam uma grande variedade de polissacarídeos sulfatados. Alguns destes polissacarídeos apresentam potente atividade biológica, principalmente antiviral e/ou anticoagulante. O objetivo do presente trabalho foi analisar a estrutura química de polissacarídeos sulfatados e seus produtos de degradação parcial obtidos da clorófito *G. oxysperma* e a avaliação de sua atividade antitumoral. A alga seca e moída foi submetida a extrações aquosas sequenciais (80°C, 4h) originando as frações OX-1 a OX-5. As análises químicas e espectroscópicas demonstraram que as frações brutas são constituídas por heteroramnanas sulfatadas, e devido a sua similaridade foram reunidas gerando a fração OX-6. As heteroramnanas sulfatadas foram submetidas à degradação controlada de Smith originando a fração OX-6S altamente sulfatada (34% de grupos sulfato), contendo polímeros de menor massa molecular em relação aos de origem. Após fracionamento cromatográfico (DEAE-Sephacel), duas subfrações de maior rendimento foram obtidas: OX-6Sb (26%) e OX-6Sc (51%). Estas subfrações também apresentaram elevados teores de sulfato (34% e 41%) e massa molecular de 109 e 251 kDa, respectivamente. As frações OX-6Sb e OX-6Sc são estruturalmente distintas, constituídas por diferentes tipos de unidades de ramnose 3- e 2-ligadas na relação de 2:1 e 1,8:1, respectivamente. As unidades de ramnose 3-ligadas em OX-6Sb e OX-6Sc encontram-se sulfatadas em C-2 (36% e 31%), C-4 (25% e 42%) e em C-2 e C-4 (7%), respectivamente. Enquanto as unidades de ramnose 2-ligadas encontram-se sulfatadas em C-4 (59% e 46%) e C-3 e C-4 (20% e 45%) para as frações OX-6Sb e OX-6Sc, respectivamente. Os pontos de ramificação nas duas frações contêm unidades de ramnose e ácido glucurônico como terminais não redutores e ramnose 4-sulfato. Deste modo, em termos estruturais, a fração OX-6Sc se diferencia principalmente da fração OX-6Sb por possuir maiores percentagens de ramnose 2-ligada 3,4-sulfatadas (2,4:1), bem como unidade de ramnose 3-ligada 4-sulfatada (1,5:1). Para os ensaios de atividade antitumoral, foram avaliadas as frações polissacarídicas OX-6, OX-6S, OX-6Sb e OX-6Sc nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL em duas linhagens celulares de glioma humano (U373MG e U87MG), através do ensaio de viabilidade celular do MTT. A linhagem U373MG foi mais sensível às frações OX-6S e OX-6Sc, já para a linhagem U87MG as frações mais citotóxicas foram OX-6 e OX-6Sc, e, em ambas as linhagens a concentração mais citotóxica foi de 1000 µg/mL. As frações polissacarídicas apresentaram efeitos citotóxicos diferentes, sendo a fração OX-6Sc mais eficaz na redução da viabilidade celular, sugerindo assim que as diferenças estruturais como o posicionamento de grupos sulfatos em C-3 e C-4 das unidades de ramnose 2-ligadas, bem como no C-4 das unidades 3-ligadas, juntamente com a massa molecular, são fatores determinantes na atividade citotóxica. Desta forma, os polissacarídeos de *G. oxysperma* apresentaram atividade antitumoral promissora em linhagens celulares de glioma humano.

Paravras-chave: Algas verdes. Polissacarídeos sulfatados. Degradação controlada de Smith. Estrutura química. Atividade antitumoral.

ABSTRACT

A wide variety of sulfated polysaccharides are biosynthesized by green algae (Chlorophyta). Some of these polysaccharides have potent biological activity, especially antiviral and/or anticoagulant. The aim of this study was to analyze the chemical structure of sulfated polysaccharides and their partial degradation products obtained from the chlorophyte *G. oxysperma* and evaluation of antitumor activity. The dried and ground seaweed was sequentially extracted in water (80°C, 4 h) resulting in OX-1 OX-5 fractions. The chemical and spectroscopic analysis showed that the raw fractions consist of sulfated heterorhamnan, and by that similarity they were joined together in fraction OX-6. The sulfated heterorhamnan were subjected to controlled degradation of Smith resulting fraction OX-6S highly sulfated (34% of sulfate groups), with polymers of lower molecular weight relative to origin weight. After chromatographic fractionation (DEAE-Sephacel), two highest yield subfractions were obtained: OX-6Sb (26%) and OX-6Sc (51%). These subfractions also exhibited high levels of sulfate (34% and 41%) and molecular mass of 109 and 251 kDa, respectively. Fractions OX-6Sb and OX-6Sc are structurally distinct, constituted by 3- and 2-linked rhamnose units with 2:1 and 1,8:1 ratio, respectively. The 3-linked rhamnosyl residues are sulphated at C-2 (36% and 31%), C-4 (25% and 42%), C-2 and C-4 (7%) and the 2-linked rhamnosyl residues are sulphated at C-4 (59% and 46%), C-3 and C-4 (20% and 45%) for fractions OX-6Sb and OX-6Sc, respectively. The branch points in both fractions contain rhamnose units and glucuronic acid as non-reducing terminal and 4-sulfated rhamnose. In structural terms, the fraction OX-6Sc differs mainly from the fraction OX-6Sb by having higher percentages of rhamnose 2-linked 3,4-sulfated (2,4:1), as well higher percentages of rhamnose units 3-linked 4-sulfated (1,5:1). For the testing of antitumor activity, polysaccharide fractions OX-6, OX-6S, OX-6Sb and OX-6Sc were evaluated at concentrations of 10, 100 and 1000 µg/mL in two human glioma cell lines (U373MG and U87MG), by testing cell viability with MTT. The line U373MG was more sensitive to the fractions OX-6S and OX-6Sc, in strain U87MG the more cytotoxic fractions were OX-6 and OX-6Sc, and for both strains the more cytotoxic concentration was 1000 µg/mL. The polysaccharide fractions had different cytotoxic effects, the fraction OX-6Sc are more effective in reducing cell viability, indicating that the structural differences in the positioning of sulphate groups at C-3 and C-4 of rhamnose units 2-linked, as well at C-4 of rhamnose units 3-linked, with the molecular weight are determining factors in cytotoxicity. The polysaccharides of *G. oxysperma* showed promising antitumor activity in human glioma cell lines.

Keywords: Green algae. Sulfated polysaccharides. Controlled degradation of Smith's. Chemical structure. Antitumor activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NA HETERORAMNANA SULFATADA DE <i>G. oxysperma</i>	25
FIGURA 2 – EXEMPLO DAS ETAPAS DO MÉTODO DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH EM UNIDADE DE α -L-RAMNOSE PIRANOSÍDICA: (a) α -L-RAMNOSE, (b) DIALDEÍDO, (c) ACETAL CÍCLICO E (d) ÁLCOOL	27
FIGURA 3 – ASPECTO GERAL DA CLORÓFITA <i>G. oxysperma</i>	36
FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA ALGA VERDE <i>G. oxysperma</i>	51
FIGURA 5 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DAS FRAÇÕES BRUTAS DE <i>G. oxysperma</i>	54
FIGURA 6 – ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES BRUTAS DE <i>G. oxysperma</i> : (a) OX-2 (b) OX-3 (c) OX-4 e (d) OX-5.....	55
FIGURA 7 – ESTRUTURA TEÓRICA DE HETERORAMNANA SULFATADA ANTES (a) E APÓS DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (b).....	57
FIGURA 8 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DA FRAÇÃO SUBMETIDA À DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (OX-6S).....	59
FIGURA 9 – COMPARAÇÃO DO PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DA FRAÇÃO SUBMETIDA À DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (OX-6S) E DA FRAÇÃO NATIVA (OX-6).....	59
FIGURA 10 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO NATIVA OX-6 (a) E DA FRAÇÃO DEGRADADA DE SMITH OX-6S (b)	60
FIGURA 11 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DA REGIÃO ANOMÉRICA DAS FRAÇÕES OX-6 (a) E OX-6S (b).....	61
FIGURA 12 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DA REGIÃO DO ANEL DAS FRAÇÕES OX-6 (a) E OX-6S (b).....	62
FIGURA 13 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA REGIÃO α -ANOMÉRICA DA FRAÇÃO OX-6S	63
FIGURA 14 – ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO OX-6S EM CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	64

FIGURA 15 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DAS FRAÇÕES OX-6Sa (a), OX-6Sb (b) E OX-6Sc (c).....	67
FIGURA 16 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO DE ORIGEM OX-6S (a) COM AS FRAÇÕES OX-6Sa (b), OX-6Sb (c) E OX-6Sc (d) OBTIDAS APÓS CROMATOGRAPHIA DE TROCA IÔNICA.....	69
FIGURA 17 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DA REGIÃO ANOMÉRICA DAS FRAÇÕES OX-6Sb (a) E OX-6Sc (b)	70
FIGURA 18 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DA REGIÃO DO ANEL DAS FRAÇÕES OX-6Sb (a) E OX-6Sc (b)	72
FIGURA 19 – ESPECTROS DE RMN DE ^1H DA REGIÃO ANOMÉRICA DAS FRAÇÕES OX-6S (a) OX-6Sb (b) E OX-6Sc (c).....	73
FIGURA 20 – ESQUEMA DE REFRACIONAMENTO DA FRAÇÃO OX-6Sc EM CROMATOGRAPHIA DE TROCA IÔNICA	74
FIGURA 21 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DAS FRAÇÕES OX-6Sc5, OX-6Sc6 E OX-6Sc7	76
FIGURA 22 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO OX-6Sc (a) COMPARADA COM AS FRAÇÕES OX-6Sc5 (b) E OX-6Sc6 (c)...	76
FIGURA 23 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROCESSO DE CARBOXI-REDUÇÃO DO ÁCIDO GLUCURÔNICO COM NaBH_4 e NaBD_4	78
FIGURA 24 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO NATIVA OX-6Sb (a), FRAÇÃO CARBOXI-REDUZIDA OX-6Sb-R (b) E CARBOXI-REDUZIDA E DESSULFATADA OX-6Sb-RD (c).....	81
FIGURA 25 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO NATIVA OX-6Sc (a), FRAÇÃO CARBOXI-REDUZIDA OX-6Sc-R (b) E CARBOXI-REDUZIDA E DESSULFATADA OX-6Sc-RD (c)	82
FIGURA 26 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES CARBOXI-REDUZIDAS E DESSULFATADAS OX-6Sb-RD (a) E OX-6Sc-RD (b).....	83
FIGURA 27 – PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (OX-6Sb E OX-6Sc)	92
FIGURA 28 – ESPECTROS DE HSQC DA REGIÃO ANOMÉRICA DAS FRAÇÕES NATIVAS: OX-6Sb (a) E OX-6Sc (c) E DESSULFATADAS: OX-6Sb-RD (b) E OX-6Sc-RD (d)	94

FIGURA 29 – ESPECTROS DE HSQC DA REGIÃO DO ANEL DAS FRAÇÕES NATIVAS: OX-6Sb (a) E OX-6Sc (c) E DESSULFATADAS: OX-6Sb-RD (b) E OX-6Sc-RD (d)	95
FIGURA 30 – PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH CARBOXI-REDUZIDOS E DESSULFATADOS (OX-6Sb-RD E OX-6Sc-RD)	97
FIGURA 31 – ESPECTROS DE RMN ¹ H DA REGIÃO ANOMÉRICA DAS FRAÇÕES NATIVAS: OX-6Sb (a) E OX-6Sc (c) E DESSULFATADAS: OX-6Sb-RD (b) E OX-6Sc-RD (d)	99
FIGURA 32 – FOTOS DAS LINHAGENS U373MG (a) E U87MG (b)	101
FIGURA 33 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U373MG APÓS TRATAMENTO COM OS POLISSACARÍDEOS POR 24 HORAS.....	104
FIGURA 34 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U373MG APÓS TRATAMENTO COM OS POLISSACARÍDEOS POR 48 HORAS.....	106
FIGURA 35 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U373MG APÓS TRATAMENTO COM OS POLISSACARÍDEOS POR 72 HORAS.....	108
FIGURA 36 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U373MG TRATADAS COM 1000 µg/mL DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS: OX-6 (a), OX-6S (b), OX-6Sb (c) E OX-6Sc (d)	109
FIGURA 37 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U373MG TRATADAS COM 100 µg/mL DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS: OX-6 (a), OX-6S (b), OX-6Sb (c) E OX-6Sc (d)	110
FIGURA 38 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U87MG APÓS TRATAMENTO COM OS POLISSACARÍDEOS POR 24 HORAS.....	112
FIGURA 39 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U87MG APÓS TRATAMENTO COM OS POLISSACARÍDEOS POR 48 HORAS.....	114
FIGURA 40 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U87MG APÓS TRATAMENTO COM OS POLISSACARÍDEOS POR 72 HORAS.....	115

FIGURA 41 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U87MG TRATADAS COM 1000 µg/mL DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS: OX-6 (a), OX-6S (b), OX-6Sb (c) E OX-6Sc (d) 116

FIGURA 42 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U87MG TRATADAS COM 100 µg/mL DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS: OX-6 (a), OX-6S (b), OX-6Sb (c) E OX-6Sc (d) 117

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES BRUTAS OBTIDAS DE <i>G. oxysperma</i>	52
TABELA 2 – MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES BRUTAS DE <i>G. oxysperma</i>	53
TABELA 3 – ANÁLISES QUÍMICAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO SUBMETIDA À DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (OX-6S) E FRAÇÃO NATIVA (OX-6)	58
TABELA 4 – RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS APÓS CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DA FRAÇÃO OX-6S	65
TABELA 5 – MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS APÓS CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DE OX-6S	66
TABELA 6 – ANÁLISES QUÍMICAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DE MAIOR RENDIMENTO	75
TABELA 7 – ANÁLISES QUÍMICAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OX-6Sb E OX-6Sc CARBOXI-REDUZIDAS E CARBOXI-REDUZIDAS E DESSULFATADAS	79
TABELA 8 – ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES OX-6Sb E OX-6Sc CARBOXI-REDUZIDAS E CARBOXI-REDUZIDAS E DESSULFATADAS	85
TABELA 9 – UNIDADES PRESENTES NAS FRAÇÕES NATIVAS OX-6Sb E OX-6Sc DE ACORDO COM OS DADOS DE METILAÇÃO	90
TABELA 10 – PROPORÇÃO DE UNIDADES DE RAMNOSE 3- E 2-LIGADAS PRESENTES NAS FRAÇÕES OX-6Sb E OX-6Sc	91
TABELA 11 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DAS FRAÇÕES DESSULFATADAS OX-6Sb-RD E OX-6Sc-RD	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$[\alpha]_D^{25^\circ}$	– rotação óptica específica (a 25°C)
BaCl ₂	– cloreto de bário
BaSO ₄	– sulfato de bário
BSA	– soro albumina bovina
CH ₃	– grupo metil
CLG-EM	– cromatografia líquida gasosa acoplada à espectrometria de massa
CMC	– 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida
D ₂ O	– água deuterada
dn/dc	– variação do índice de refração em relação a concentração
DMEM	– <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	– dimetilsulfóxido
FID	– detector de ionização de chama
GAG	– glicosaminoglicanos
HBSS	– solução salina balanceada de Hank
HPSEC-MALLS-RI	– cromatografia de exclusão estérica de alta resolução acoplada a detectores de índice de refração e espalhamento de luz
HSQC	– <i>heteronuclear single quantum correlation spectroscopy</i>
HSV-1	– vírus herpes simplex tipo 1
HSV-2	– vírus herpes simplex tipo 2
IC ₅₀	– concentração inibitória 50%
ICH ₃	– iodometano
IR	– índice de refração
m/v	– relação entre massa e volume
m/z	– relação entre massa e carga
m-NaIO ₄	– metaperiodato de sódio
MTT	– brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
Mw	– massa molecular ponderal média
NaBD ₄	– borodeutério de sódio
NaBH ₄	– borohidreto de sódio
NaNO ₃	– nitrito de sódio
NaOH	– hidróxido de sódio

ppm	– partes por milhão
RMN ¹³C	– ressonância magnética nuclear Carbono 13
RMN ¹H	– ressonância magnética nuclear Hidrogênio
SFB	– soro fetal bovino
TFA	– ácido trifluoracético
TNR	– terminal não redutor da cadeia polissacarídica
v/v	– relação entre volume e volume
VEGF	– fator de crescimento endotelial vascular

OX-1 a OX-5 – frações brutas obtidas por extrações aquosas a 80 °C de *G. oxysperma*

OX-6 – frações brutas de *G. oxysperma* reunidas (OX-2 a OX-5)

OX-6S – fração OX-6 após degradação controlada de Smith

OX-6Sb – fração degradada de Smith eluída com NaCl 1M em cromatografia de troca iônica

OX-6Sc – fração degradada de Smith eluída com NaCl 1,5M em cromatografia de troca iônica

OX-6Sb-R, OX-6Sc-R – frações carboxi-reduzidas

OX-6Sb-RD, OX-6Sc-RD – frações carboxi-reduzidas e dessulfatadas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 ALGAS MARINHAS	20
3.1.1 Algas verdes	21
3.2 MACROALGA VERDE MARINHA <i>Gayralia oxysperma</i>	23
3.2.1 Distribuição da macroalga <i>G. oxysperma</i>	23
3.2.2 Composição química e estrutura dos polissacarídeos presentes na espécie <i>Gayralia oxysperma</i>	24
3.3 DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH	26
3.4 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE MACROALGAS MARINHAS	27
3.4.1 Distribuição dos polissacarídeos sulfatados na natureza	27
3.4.2 Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados	29
3.5 ATIVIDADE ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS	31
3.6 GLIOMAS	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 ESPÉCIE ESTUDADA E SEU POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO	36
4.2 COLETA E PROCESSAMENTO	37
4.3 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA ALGA <i>Gayralia oxysperma</i>	37
4.4 DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH	38
4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS	39
4.5.1 Carboidratos totais	39
4.5.2 Proteínas totais	39
4.5.3 Grupos sulfato	39
4.5.4 Ácidos Urônicos	40
4.5.5 Polarimetria	40
4.6 MÉTODOS HIDROLÍTICOS	40
4.6.1 Hidrólise ácida total	40
4.7 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DOS POLISSACARÍDEOS	41
4.7.1 Carboxi-redução	41
4.7.2 Dessulfatação por tratamento solvolítico	42
4.8 ANÁLISE DE METILAÇÃO	42
4.9 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	43
4.9.1 Cromatografia de troca iônica	43
4.9.2 Cromatografia Líquido-Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CLG-EM)	44
4.9.3 Cromatografia de Gel Permeação (HPSEC-MALLS)	45

4.10 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	46
4.10.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	46
4.10.1.1 Técnicas de RMN Monodimensionais	46
a) Ressonância Magnética Nuclear de Carbono –13 (RMN de ^{13}C)	46
b) Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN – ^1H).....	46
4.10.1.2 Técnicas de RMN Bidimensionais	47
a) HSQC (<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy</i>)	47
4.11 ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>in vitro</i> DAS HETERORAMNANAS DE	
<i>G. oxysperma</i>	47
4.11.1 Linhagens celulares utilizadas.....	47
4.11.2 Preparação das frações polissacarídicas para o ensaio biológico	48
4.11.3 Determinação da viabilidade celular de células tumorais	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>G. oxysperma</i>	50
5.2 RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES BRUTAS	52
5.3 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES BRUTAS	53
5.4 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DAS FRAÇÕES BRUTAS	54
5.5 ANÁLISES DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES BRUTAS DE <i>G. oxysperma</i>	54
5.6 DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH	56
5.6.1 Análises químicas e composição monossacarídica da fração degradada	
de Smith (OX-6S).....	57
5.6.2 Análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS-IR da fração degradada	
de Smith (OX-6S)	58
5.6.3 Análise de RMN de ^{13}C da fração degradada de Smith	60
5.7 FRACIONAMENTO DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE	
SMITH (OX-6S).....	64
5.7.1 Análises químicas e composição monossacarídica das subfrações obtidas	
após cromatografia de troca iônica da fração OX-6S.....	64
5.7.2 Análise de homogeneidade das frações de maior rendimento obtidas após	
cromatografia de troca iônica da fração OX-6S	66
5.7.3 Análise de RMN de ^{13}C das frações OX-6Sa, OX-6Sb e OX-6Sc	68
5.8 REFRACIONAMENTO DA FRAÇÃO OX-6Sc EM CROMATOGRAFIA DE	
TROCA IÔNICA.....	74
5.8.1 Rendimento, análises químicas e composição monossacarídica.....	75
5.8.2 Análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS-IR e RMN de ^{13}C	75
5.9 CARBOXI-REDUÇÃO E DESSULFATAÇÃO DAS FRAÇÕES OX-6Sb E	
OX-6Sc	77
5.9.1 Carboxi-redução das frações OX-6Sb e OX-6Sc	77
5.9.2 Dessulfatação solvolítica das frações OX-6Sb e OX-6Sc	80
5.9.3 Análise de RMN de ^{13}C das frações carboxi-reduzidas (OX-6Sb-R e	
OX-6Sc-R) e carboxi-reduzidas e dessulfatadas (OX-6Sb-RD e	
OX-6Sc-RD).....	80

5.10 ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES CARBOXI-REDUZIDAS (OX-6Sb-R, OX-6Sc-R) E CARBOXI-REDUZIDAS E DESSULFATADAS (OX-6Sb-RD, OX-6Sc-RD)	84
5.10.1 Análise de metilação da fração OX-6Sb carboxi-reduzida (OX-6Sb-R) e carboxi-reduzida e dessulfatada (OX-6Sb-RD).....	86
5.10.2 Análise de metilação da fração OX-6Sc carboxi-reduzida (OX-6Sc-R) e carboxi-reduzida e dessulfatada (OX-6Sc-RD).....	88
5.10.3 Análise comparativa dos resultados de metilação dos produtos de degradação controlada de Smith (OX-6Sb e OX-6Sc)	89
5.11 ANÁLISES DE RMN BIDIMENSIONAIS DAS FRAÇÕES OX-6Sb E OX-6Sc	93
5.12 ATIVIDADE ANTITUMORAL.....	101
5.12.1 Análise da viabilidade de células tumorais	102
5.12.1.1 Viabilidade celular de células U373MG após tratamento com polissacarídeos por 24, 48 e 72 horas.....	102
5.12.1.2 Viabilidade celular de células U87MG após tratamento com polissacarídeos por 24, 48 e 72 horas.....	112
5.12.1.3 Análise comparativa dos resultados de viabilidade celular das linhagens U373MG e U87MG	118
6 CORRELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA DAS HETERORAMNANAS SULFATADAS E ATIVIDADE ANTITUMORAL	120
7 CONCLUSÕES	122
REFERÊNCIAS.....	124

1 INTRODUÇÃO

As algas marinhas estão amplamente distribuídas ao longo da costa brasileira e possuem grande importância ambiental, econômica e social. São responsáveis por grande parte da produção de oxigênio atmosférico e base da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos, além de estar presentes na cultura alimentar de diversos países asiáticos. As macroalgas marinhas possuem um alto valor comercial devido às propriedades espessantes, estabilizantes e gelatinizantes de seus polissacarídeos, os quais são amplamente utilizados como fonte de matérias-primas nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

Recentemente os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas têm sido investigados quanto a suas propriedades biológicas, dentre elas atividades antitumoral, anticoagulante, antiviral, anti-hiperlipidêmica e antioxidante. Sendo assim, esses polissacarídeos são considerados moléculas farmacologicamente ativas, podendo ser utilizados pela indústria farmacêutica na elaboração de novos medicamentos naturais.

Estudos sobre a elucidação da estrutura química dos polissacarídeos solúveis em meio aquoso da clorófito *G. oxysperma*, de interesse neste trabalho, demonstrou que os mesmos são constituídos principalmente por ramnose, altamente sulfatados e possuem potente atividade anti-herpética frente aos vírus HSV-1 e HSV-2 (CASSOLATO *et al.*, 2008). Ressalta-se que frações de menor massa molecular altamente sulfatadas, obtidas a partir de heteroramnanas sulfatadas por degradação controlada de Smith, possam representar moléculas de interesse para a avaliação de atividades biológicas.

Tendo em vista a biodiversidade nacional de macroalgas marinhas verdes, a bioatividade de seus polissacarídeos, e a escassez de estudos estruturais e de aplicação biológica dessas macroalgas marinhas, o estudo de tal propriedade poderá abrir um novo campo de utilização dessa biomassa. Além disso, a utilização de fragmentos de menor massa molecular nos ensaios de atividade antitumoral poderá facilitar a correlação entre estrutura e atividade biológica dessas moléculas altamente complexas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem por objetivo geral a análise estrutural química de polissacarídeos sulfatados e de seus produtos de menor massa molecular obtidos da macroalga verde marinha *Gayralia oxysperma* e a avaliação de sua atividade antitumoral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Extrair os polissacarídeos solúveis em meio aquoso a 80°C;
- ✓ Obter fragmentos de menor massa molecular através do método de degradação controlada de Smith;
- ✓ Fracionar os polissacarídeos de menor massa molecular em cromatografia de troca iônica;
- ✓ Determinar a estrutura química dos produtos de degradação controlada de Smith através de análises químicas e espectroscópicas;
- ✓ Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* das heteroramnanas sulfatadas e dos produtos de degradação controlada de Smith em células tumorais de glioma humano;
- ✓ Correlacionar a estrutura química das heteroramnanas de *G. oxysperma* com sua atividade antitumoral.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ALGAS MARINHAS

As algas marinhas pertencem ao grupo não homogêneo de organismos denominado Algae que se encontra subdividido entre os três diferentes reinos: Monera ou Bactéria, Protista e Reino Plantae.

O Reino Monera é constituído pelas algas azuis ou cianofíceas, organismos unicelulares, procariontes e autótrofos que habitam ambientes úmidos e necessitam de poucos nutrientes para sobreviver, sendo os primeiros seres vivos a aparecerem no planeta (CARVALHO; ROQUE, 2000; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). Esses organismos habitam oceanos, águas doces, solos, rochas e superfície de outros vegetais (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

O Reino Protista é composto por organismos eucariontes, unicelulares e pluricelulares (de organização simples), autótrofos ou heterótrofos. As algas pertencentes a este Reino apresentam pigmentos (clorofilas, caroteno e xantofilas) o que permite a realização da fotossíntese (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

No Reino Plantae, os organismos são eucariontes, pluricelulares e autótrofos. Esse reino é composto pelas algas marinhas, que são divididas nos filos: Rhodophyta, Phaeophyta e Chlorophyta. O filo Rhodophyta, compreende as algas vermelhas, contendo o pigmento ficoeritrina em suas células, que é responsável pela sua coloração avermelhada. O filo Phaeophyta é composto pelas algas pardas, organismos pluricelulares predominantemente marinhos, e o filo Chlorophyta compreende a maioria das algas verdes (CARVALHO; ROQUE, 2000; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

3.1.1 Algas verdes

Algas verdes são organismos eucariotos fotossintetizantes amplamente distribuídos na natureza. Estão presentes principalmente em ambientes aquáticos, tanto em oceanos quanto em águas doces, em solos úmidos ou troncos, e até mesmo sobre a neve. Além disso, podem formar líquens quando associados com fungos (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). As algas clorófitas através da fotossíntese são as principais responsáveis pela produção de oxigênio molecular disponível no planeta (LEWIS; McCOURT, 2004; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

As algas verdes são compostas por espécies macroscópicas e microscópicas e possuem cloroplastos com duas membranas contendo dois tipos de clorofilas (A e B), o que as proporciona coloração esverdeada. Além disso, possuem pigmentos acessórios como betacaroteno e xantofilas, sendo o amido sua substância de reserva. Essas algas são consideradas ancestrais das plantas terrestres, visto que ambas possuem o mesmo tipo de clorofila (LEWIS; McCOURT, 2004; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

As algas verdes evoluíram em duas grandes linhagens: Chlorophyta e Charophyta. O filo Chlorophyta inclui a maioria das algas que têm sido tradicionalmente denominadas algas verdes, além de possuir a maioria das espécies de algas verdes descritas. Esse filo contém três grandes classes: Chlorophyceae, Pleurostrophyceae e Ulvophyceae. O filo Charophyta além de possuir algas verdes é composto por um grande número de plantas terrestres que evoluíram das algas (LEWIS; McCOURT, 2004).

A macroalga verde marinha *Gayralia oxysperma*, de interesse neste estudo, pertence ao filo Chlorophyta, e à classe Ulvophyceae. Essa classe é predominantemente marinha e compreende algumas das mais belas algas verdes. Ele inclui também as mais conhecidas algas verdes marinhas, tais como a alface-do-mar *Ulva*, além de *Codium*, *Caulerpa* e *Acetabularia*, e gêneros de água doce como *Cladophora*, *Rhizoclonium* e *Pithophora* (LEWIS; McCOURT, 2004).

As macroalgas verdes são comuns ao longo da costa brasileira, sendo mais abundantes e diversificadas na costa nordeste do país e nos costões rochosos do Espírito Santo e Santa Catarina, embora sejam encontradas em menor diversidade nas praias arenosas do centro-sul e sul do estado de São Paulo e no Paraná (OLIVEIRA *et al.*, 1999). Apesar de sua ampla distribuição na natureza os estudos estruturais e de atividades biológicas dessas algas são escassos se comparados com as algas dos filos Rhodophyta e Phaeophyta. Além disso, os polissacarídeos que compõe a parede celular dessas algas possuem uma grande diversidade estrutural, com diferentes constituintes monossacarídeos e grupos substituintes, (PAINTER, 1983; KLOAREG e QUATRANO, 1988), não havendo uma estrutura repetitiva de unidades monossacarídicas como é observado, por exemplo, nas algas vermelhas.

No ecossistema aquático as algas têm diversas funções: produzem biomassa através da energia solar, atuam na mineralização e no ciclo dos elementos químicos, produzem oxigênio que é utilizado pelos organismos aquáticos, além de servirem de alimentos para animais e humanos (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). As macroalgas verdes têm sido utilizadas há milênios como fontes alimentares de povos orientais. Seu interesse nutricional está baseado nos altos índices de fibras dietéticas, ácidos graxos poliinsaturados, vitaminas e minerais além de seu reduzido valor calórico (ITO; HORI, 1989; ZUBIA *et al.*, 2009). Estudos de composição nutricional da alga verde marinha *Ulva lactuca* demonstraram que ela contém altos índices de fibra dietética, além de tocoferóis, ácidos graxos monoinsaturados e aminoácidos essenciais, demonstrando ser um alimento de alto valor nutricional (ORTIZ *et al.*, 2006).

Além de serem utilizadas como alimentos, as algas marinhas são bastante empregadas na indústria alimentícia devido às propriedades espessantes, estabilizantes e gelatinizantes de seus polissacarídeos, e recentemente têm sido investigadas quanto a suas atividades biológicas (DAMONTE; MATULEWICZ; CERESO, 2004; YUANA *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2010).

3.2 MACROALGA VERDE MARINHA *Gayralia oxysperma*

3.2.1 Distribuição da macroalga *G. oxysperma*

Gayralia oxysperma é uma macroalga verde monostromática, encontrada em ambientes marinhos, que possui grande importância econômica. É utilizada principalmente na alimentação como substituinte para a alga *Porphyra* spp na fabricação de “nori”, utilizada também no preparo de geléias, temperos e na indústria de cosméticos (PELLIZZARI *et al.*, 2007).

G. oxysperma é encontrada ao longo da costa brasileira sendo mais abundante no sul do Brasil, e segundo Pellizzari *et al.* (2008), tem sido erroneamente identificada como *Ulvaria oxysperma* (Kützinger) Blinding, ou *Monostroma oxyspermum* (Kützinger) Doty.

Durante as últimas décadas na costa paranaense, *G. oxysperma* tem sido esporadicamente colhida por moradores e vendida para restaurantes japoneses com a finalidade de alimentação, porém sua produção é escassa no meio ambiente. Devido a esse fato, Pellizzari, Oliveira e Yokoya (2004) e Pellizzari *et al.* (2007) estudaram as características e as melhores condições de cultivo das espécies de *Gayralia*, e elaboraram uma nova técnica de cultivo em redes suspensas, visando desenvolver uma fonte de renda sustentável o ano inteiro aos moradores da região.

As algas obtidas para os estudos neste trabalho foram cultivadas na baía de Paranaguá, município de Paranaguá-PR, sendo identificadas pelo Dr. Eurico Cabral de Oliveira (Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo) e cedidas pela Doutora Franciane M. Pellizzari (Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade Estadual de Filosofia, Ciências e Letras de Paranaguá).

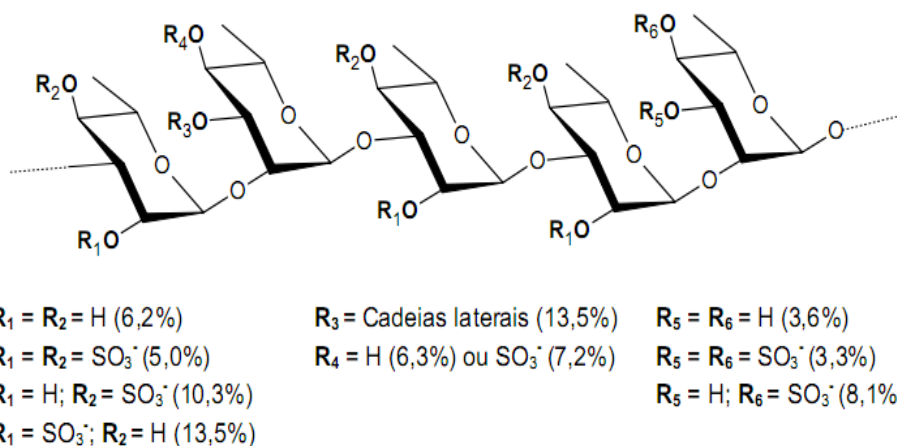
Os estudos a respeito da estrutura química de *G. oxysperma* na literatura são escassos, se restringindo somente ao trabalho feito por Cassolato *et al.* (2008). A autora determinou a estrutura química fina dos polissacarídeos que compõem a macroalga verde e avaliou sua atividade antiviral.

3.2.2 Composição química e estrutura dos polissacarídeos presentes na espécie *Gayralia oxysperma*

Segundo Cassolato *et al.* (2008) os polissacarídeos sintetizados por *G. oxysperma* foram obtidos por extrações aquosas seqüenciais a 25°C e 80°C gerando seis frações brutas, sendo a fração de maior rendimento obtido na primeira extração a quente. As frações brutas foram constituídas principalmente por unidades monossacarídicas de ramnose (56,0 – 88,6 mol%), sendo também observados outros monossacarídeos como xilose (3,9 – 10,4 mol%), arabinose (3,0 – 10,1 mol%), glucose (2,8 – 21,0 mol%), galactose (2,1 – 6,2 mol%) e manose (1,2 – 2,5 mol%). Os teores de sulfato (21,2 – 30,9%) mostraram-se semelhantes aos encontrados para outras algas da ordem Ulvales (6,0 – 28,0%). Adicionalmente, foi observado nas frações analisadas a presença de ácidos urônicos (12,2 – 17,0%), correspondentes aos ácidos glucurônico e galacturônico, demonstrando que *G. oxysperma* é composta por polissacarídeos ácidos.

O polissacarídeo da fração de maior rendimento foi purificado por ultrafiltração em membrana com limite de exclusão de 300 kDa. A fração retida na membrana apresentou-se homogênea com massa molecular ponderal média de 1519 kDa, sendo essa fração selecionada para os estudos estruturais. As análises de metilação e composição monossacarídica demonstraram que a fração purificada correspondia a uma heteroramnana ramificada e altamente sulfatada, contendo unidades de α -L-ramnose 2,3-dissubstituídas, 2- e 3-ligadas na relação de aproximadamente 1:1:3, as quais se encontravam 53,0, 54,0 e 29,0% sulfatadas em C-4. Ademais, os grupos sulfato também estavam presentes nos carbonos C-2 (38,0%), C-2 e C-4 (14,0%) das unidades de ramnose 3-ligadas e nos C-3 e C-4 (22,0%) das unidades 2-ligadas. Os ácidos urônicos (glucurônico e galacturônico) encontravam-se principalmente sulfatados em C-2 (80,0%). Deste modo, foi verificado que a heteroramnana apresentava cadeia principal com um ponto de ramificação a cada cinco unidades de ramnose (CASSOLATO *et al.*, 2008).

A Figura 1 esquematiza as principais unidades de ramnose presentes na heteroramnana sulfatada da fração purificada por Cassolato *et al.* (2008).



NOTA: % = mol%. Cadeias laterais contêm como terminais não redutores: GlcpA 2-sulfato (5 mol%) ou GalpA 2-sulfato (~4 mol%) ou Xilp (5 mol%).

FIGURA 1 – PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NA HETERORAMNANA SULFATADA DE *G. oxysperma*

FONTE: CASSOLATO, J. E. F. (2008)

É importante ressaltar que a heteroramnana de *G. oxysperma*, após degradação controlada de Smith, originou uma fração de menor massa molecular altamente sulfatada, cuja atividade biológica não foi avaliada.

Deste modo, neste estudo, serão obtidos fragmentos de menor massa molecular através do método de degradação controlada de Smith, além da utilização destes fragmentos em ensaios de atividade biológica. O estudo de tais frações com menor massa molecular poderá adicionar novos dados estruturais a estas moléculas altamente complexas podendo facilitar a correlação entre estrutura e atividade biológica.

3.3 DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH

Devido à grande complexidade estrutural dos polissacarídeos ácidos das clorófitas (LAHAYE; BRUNEL; BONNIN, 1997; HAYAKAWA *et al.*, 2000; RAY, 2006), metodologias utilizadas para a redução de sua massa molecular, como o método de degradação controlada de Smith, são importantes recursos para auxiliar e estudo estrutural de tais polímeros.

O método de degradação controlada de Smith inicia-se com a oxidação de moléculas que possuam hidroxilas vicinais pelo íon periodato, com a clivagem específica de ligações C-C. As unidades resistentes a essa oxidação permanecem intactas, mesmo após hidrólise ácida, devido sua realização em condições suaves. Isto se deve ao fato de que os derivados alcoólicos, por serem acetais verdadeiros são mais sensíveis a ácidos, enquanto que as ligações glicosídicas são mais resistentes, nas mesmas condições (CORRÊA, 1971).

A metodologia utilizada neste estudo foi descrita por Goldstein *et al.* (1965), onde inicialmente é realizada a oxidação do polissacarídeo com periodato de sódio, com a clivagem das ligações somente entre carbonos que possuam hidroxilas vicinais. Usando uma unidade de α -L-ramnose piranosídica como exemplo (FIGURA 2), após oxidação com periodato é obtido um dialdeído (FIGURA 2b) e o ácido fórmico, sendo o dialdeído subsequente reduzido com NaBH_4 para gerar seu correspondente álcool (FIGURA 2d). Ao contrário do que se acreditava, foi verificado que os dialdeídos não existem na forma aldeídica livre, mas sim como acetais cíclicos (FIGURA 2c), visto que eles não apresentavam absorção nas regiões do infravermelho para grupos aldeídos, além de se comportarem como alcoóis quando tratados com agentes acilantes. Uma diferença importante entre esses grupos é que os alcoóis (acetais verdadeiros) são rapidamente hidrolisados com ácido mineral diluído a temperatura ambiente, sendo os acetais cíclicos e as ligações glicosídicas relativamente mais estáveis (GOLDSTEIN *et al.*, 1965; CORRÊA, 1971).

Sendo assim, por reconhecer a instabilidade dos grupos alcoóis para ácidos diluídos a temperatura ambiente quando comparados com as ligações glicosídicas,

essa metodologia providenciou uma nova ferramenta para a degradação controlada de polissacarídeos. Devido a essas diferenças de estabilidade entre os acetais verdadeiros e as ligações glicosídicas é possível obter fragmentos menores de mono-, di-, tri- e oligossacarídeos para estudos estruturais mais aprofundados do polissacarídeo de origem.

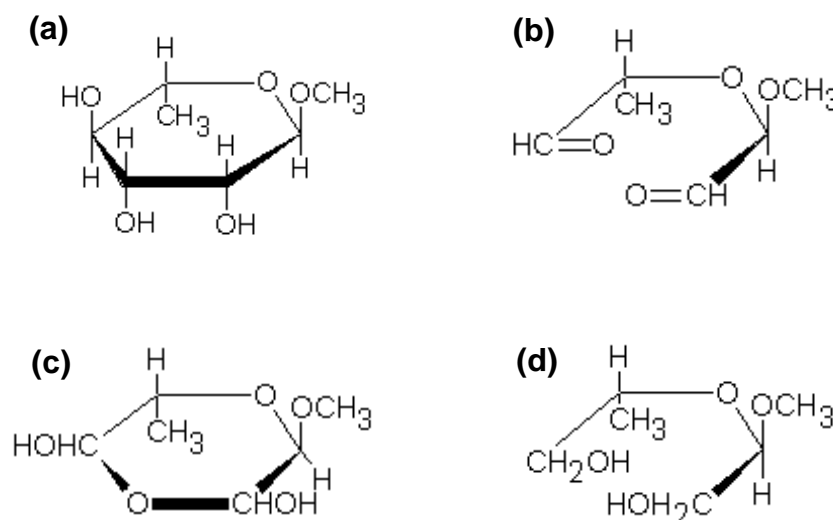


FIGURA 2 – EXEMPLO DAS ETAPAS DO MÉTODO DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH EM UNIDADE DE α -L-RAMNOSE PIRANOSÍDICA: (a) α -L-RAMNOSE, (b) DIALDEÍDO, (c) ACETAL CÍCLICO E (d) ÁLCOOL

3.4 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE MACROALGAS MARINHAS

3.4.1 Distribuição dos polissacarídeos sulfatados na natureza

Polissacarídeos sulfatados são polímeros naturais formados de unidades monossacarídicas repetitivas e dotados de carga negativa devido à presença de grupos sulfato. São largamente distribuídos na natureza, sendo encontrados em organismos animais (vertebrados e invertebrados) (CÁSSARO; DIETRICH, 1977; DREYFUSS *et al.*, 2009) e vegetais (algas e angiospermas marinhas) (PAINTER, 1983; AQUINO *et al.*, 2005) e têm despertado grande interesse devido ao seu emprego potencial como agentes farmacológicos naturais contra diversas doenças.

Em organismos animais os polissacarídeos sulfatados estão presentes como proteoglicanos, compondo a superfície celular e matriz extracelular (DREYFUSS *et al.*, 2009). Os proteoglicanos são formados por cadeias de glicosaminoglicanos (GAG) ligadas covalentemente a uma proteína central.

Os GAG são compostos por unidades repetitivas de dissacarídeos formados por hexosaminas (glucosaminas ou galactosaminas) e por ácido urônico (ácido glucurônico ou ácido idurônico) ou galactose (no queratam sulfato), e possuem substituintes sulfato em diversas posições. Os mais comuns são os galactosaminoglicanos (condroitina-sulfato, dermatam sulfato) e os glucosaminoglicanos (heparam sulfato, heparina e sulfato de queratina) (KJELLÉN; LINDAHL, 1991). O ácido hialurônico é um GAG não-sulfatado que ocorre na forma livre.

Os polissacarídeos sulfatados estão presentes também em organismos vegetais como as algas marinhas. Uma justificativa para esse fato é que com a origem da vida nos oceanos, organismos marinhos se adaptaram a grandes concentrações de sais presentes no meio e desenvolveram mecanismos para utilização dos nutrientes disponíveis. Esse ambiente repleto de íons como cloreto, sulfato, brometo e iodeto, resultou na grande presença de substâncias sulfatadas e halogenadas nas algas marinhas, sendo observado acúmulo de ânions sulfato somente em organismos que vivem em ambientes com altas concentrações desse íon (CARVALHO; ROQUE, 2000).

Aquino *et al.* (2005) constataram que organismos evolutivamente distantes presentes em ambientes marinhos possuem estruturas similares de polissacarídeos sulfatados, principalmente de fucanas e galactanas sulfatadas, sugerindo que a ocorrência desses polissacarídeos seja uma adaptação da vida marinha. Em seu estudo observaram que gramíneas marinhas, um grupo de angiospermas adaptadas ao ambiente oceânico, possuem altas quantidades de polissacarídeos sulfatados em contraste com as espécies terrestres ou de água doce.

Nas algas marinhas vermelhas (Rhodophyta) os polissacarídeos sulfatados estão presentes na forma de galactanas sulfatadas, conhecidas como carragenanas e agaranas. A cadeia principal do polissacarídeo é composta por unidades de D-galactoses unidas alternadamente por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ e $\alpha(1\rightarrow3)$. As unidades

β -ligadas sempre pertencem à série D-, enquanto as α -ligadas podem ser unidades de D- ou L-galactose, que parcialmente ocorrem como 3,6-anidrogallactose. As galactanas diferem entre si, pela presença de outros substituintes e quantidade de grupos sulfato, e formam a matriz maleável que embebe a estrutura fibrosa da parede celular (PAINTER, 1983; SHANMUGAM; MODY, 2000; CARVALHO; ROQUE, 2000; DUARTE *et al.*, 2002; AQUINO *et al.*, 2005).

Em algas pardas (Phaeophyta) estão presentes na forma de fucanas, que são heteropolissacarídeos sulfatados, compostos por fucose, xilose e ácido glucurônico, e em algumas espécies também por galactose e manose. Os compostos fucoidan, fucoidanas e sargaço também estão incluídos. Neste grupo a matriz da parede celular é formada pelas fucanas (PAINTER, 1983; SHANMUGAM; MODY, 2000; CARVALHO; ROQUE, 2000; DUARTE *et al.*, 2001a; AQUINO *et al.*, 2005).

Nas algas verdes (Chlorophyta) estão presentes heteropolissacarídeos sulfatados (como glucuronoxiloramnanas, glucuronoxiloramnogalactanas e xiloarabinogalactanas) que compõem a matriz da parede celular. Alguns polissacarídeos sulfatados de algas verdes se encontram ligados covalentemente a proteínas, sendo classificados como proteoglicanos (PAINTER, 1983; SHANMUGAM; MODY, 2000; CARVALHO; ROQUE, 2000; AQUINO *et al.*, 2005).

3.4.2 Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados

Polissacarídeos sulfatados compreendem um grupo complexo de macromoléculas de importantes propriedades biológicas. Como componentes da membrana extracelular e membrana celular, possuem um papel importante no reconhecimento, desenvolvimento, diferenciação, maturação celular e na interação célula-célula (DREYFUSS *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2009), sendo suas atividades biológicas relacionadas com a presença das cargas aniônicas. Estudos confirmam que polissacarídeos sulfatados exercem potentes atividades biológicas em comparação com polissacarídeos não-sulfatados (WANG; LI; CHEN, 2009).

As algas marinhas são a fonte mais importante de polissacarídeos sulfatados não animais, e sua estrutura varia de acordo com a espécie da alga (COSTA *et al.*, 2010). Apesar da comprovada ação biológica de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, a relação entre estrutura e atividade não é claramente estabelecida.

A presença de sulfato nos polissacarídeos pode alterar suas atividades biológicas devido à modificação na conformação de sua cadeia, sendo também através da sulfatação possível tornar substâncias apolares em substâncias solúveis em água, favorecendo sua excreção (LIU *et al.*, 2009; CARVALHO; ROQUE, 2000), além de assegurarem interações com proteínas catiônicas. Adicionalmente, as atividades biológicas das algas marinhas estão relacionadas com sua massa molecular, constituição monossacarídica, tipo de ligações glicosídicas, teor e posicionamento de grupos substituintes (sulfato, ácidos urônicos, ácido pirúvico e cadeias laterais) (SHANMUGAM; MODY, 2000).

Visto que as propriedades biológicas são influenciadas por esses fatores, modificações moleculares e transformações na estrutura de polissacarídeos despertam grande interesse. Duarte *et al.* (2001b) analisando a atividade antiviral de galactanas sulfatadas extraídas de *Bostrychia montagnei*, verificaram a correlação da atividade antiviral com o peso molecular e conteúdo de sulfato dos polissacarídeos. Da mesma forma, Qi *et al.* (2005) observaram que polissacarídeos de *Ulva pertusa* com quantidades de sulfato aumentadas através de sulfatação química, apresentaram maior efeito antioxidante com atividade seqüestradora de íons hidroxila e poder redutor maiores que a ulvana de origem.

Parish *et al.* (1999) em seu ensaio *in vitro* na identificação de drogas antitumorais, verificaram que o comprimento da cadeia de oligossacarídeos de diferentes tipos, além do grau de sulfatação e natureza da cadeia principal são características críticas para inibir a angiogênese e a atividade da heparanase (enzima que degrada matriz extracelular) e assim diminuir o crescimento tumoral.

Segundo Zhang *et al.* (2008) fragmentos de polissacarídeos sulfatados com diferentes massas moleculares da alga verde *Monostroma latissimum* têm atividades anticoagulantes similares ao polissacarídeo original. Verificaram que o decréscimo na massa molecular reduz drasticamente suas atividades anticoagulantes,

constatando que a massa molecular tem um importante efeito na atividade anticoagulante desses polissacarídeos.

Diversos polissacarídeos naturalmente sulfatados possuem atividades biológicas relatadas na literatura, dentre elas atividades antioxidante (XUE *et al.*, 2001), antiviral (DUARTE *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004; TALARICO, *et al.*, 2004; CASSOLATO *et al.*, 2008), anti-hiperlipidêmica (PENGZHAN *et al.*, 2003), antitumoral (STEVAN *et al.*, 2001; YUANA *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2010) e anticoagulante (RODRIGUES *et al.*, 2009). Embora a descoberta de metabólitos com atividades biológicas de macroalgas marinhas tem aumentado expressivamente nas últimas três décadas, poucos produtos têm chegado ao ponto final de comercialização (SMIT, 2004).

3.5 ATIVIDADE ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS

Recentemente o uso de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas como agentes antineoplásicos tem sido sugerido. Estudos demonstram que polissacarídeos sulfatados possuem atividades antiproliferativas em linhagens celulares tumorais *in vitro*, bem como inibem o crescimento de tumores em camundongos (ATHUKORALA *et al.*, 2009).

Foi verificado que polissacarídeos sulfatados induzem a apoptose de células cancerígenas, além de estimular o sistema imune do organismo (AISA *et al.*, 2005). Adicionalmente, diversos polissacarídeos sulfatados têm comprovada capacidade de modular a proliferação e migração de células endoteliais vasculares através da alteração da ligação de fatores de crescimento com seus receptores celulares, impedindo assim a angiogênese e desenvolvimento de metástases (IMAMURA; MITSUI, 1987; KOYANAGI *et al.*, 2003).

Devido à potente ação como agentes antineoplásicos, diversos estudos relatam a atividade antitumoral de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas. O polissacarídeo sulfatado purificado da alga parda *Ecklonia cava*, composto

principalmente por fucose e uma pequena quantidade de galactose, com Mw de 1381 kDa, apresentou efeito antiproliferativo promissor em linhagens tumorais de leucemia humana U-937 e HL-60. Foi verificado também que o polissacarídeo inibe a proliferação através do mecanismo de indução de apoptose (ATHUKORALA *et al.*, 2008). De maneira similar o fucoïdan (polissacarídeo sulfatado de algas pardas) de *Fucus vesiculosus* inibiu a proliferação e induziu a apoptose de linhagens celulares de linfoma humano HS-Sultan (AISA *et al.*, 2005).

Analisando a atividade antiproliferativa de 11 algas marinhas (Rhodophyta, Phaeophyta e Chlorophyta) em células de câncer cervical (HeLa), Costa *et al.* (2010) verificaram diferenças de atividades nas variadas espécies de alga devido suas diversidades estruturais, porém todos os polissacarídeos avaliados apresentaram atividade antiproliferativa de maneira dose-dependente.

Koyanagi *et al.* (2003) estudaram a atividade antitumoral de fucanas sulfatadas purificadas de algas pardas em células de Sarcoma 180, melanoma B16 e carcinoma de pulmão Lewis, indicando que sua ação antitumoral é devida a sua atividade antiangiogênica. Os autores demonstraram que tanto o polímero natural (fucana naturalmente sulfatada) quanto o totalmente sulfatado induziram a supressão do crescimento tumoral através da inibição de VEGF (um dos principais fatores de crescimento angiogênicos) pelo impedimento da ligação de VEGF ao seu receptor celular. Verificaram também que quanto maior o número de grupos sulfato na molécula mais potente foi seu efeito antiangiogênico.

Segundo Ye *et al.* (2008) fucanas sulfatadas obtidas da alga parda *Sargassum pallidum* apresentaram atividade antitumoral significativa contra células HepG2 (carcinoma hepático), A549 (adenocarcinoma alveolar) e MGC-803 (câncer gástrico), relacionadas com seu tamanho molecular e conteúdo de sulfato.

Alguns estudos demonstram que a ingestão de algas em pó diariamente pode ter efeito na imunoestimulação e modificar respostas biológicas podendo causar a supressão tumoral. Noda *et al.* (1990) pesquisaram em 46 algas marinhas, atividades antitumorais contra carcinoma *Ehrlich* e Meth-A fibrosarcoma implantados em ratos, através da administração oral de algas em pó. As algas *Sargassum ringgoldianum* (Phaeophyta) e *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) foram mais efetivas contra os dois tipos de câncer. Atividades contra carcinoma *Ehrlich* foram

encontradas também para os três tipos de algas. Além disso, algas pardas e vermelhas demonstraram atividade antitumoral contra Meth-A fibrosarcoma.

Segundo Park *et al.* (2006), a fração polissacarídica de *Capsosiphon fulvescens* (Chlorophyta), inibiu o crescimento de sarcoma-180 e exibiu atividade imunoestimulante *in vitro*. Em estudo *in vivo* oligossacarídeos de *Kappaphycus striatum* (Rhodophyta) modularam o sistema imune de ratos inoculados com S180. As carragenanas (κ -carragenanas) desta alga inibiram significativamente o crescimento do tumor transplantado, pela melhora no sistema imune (YUANA *et al.*, 2006). Resultado semelhante foi encontrado por Zhou *et al.* (2004) em λ -carragenanas de *Chondrus ocellatus*.

Stevan *et al.* (2001) verificaram alterações morfológicas celulares em células HeLa após administração de polissacarídeos extraídos de algas vermelhas e pardas. Dentre os polissacarídeos testados, as fucanas sulfatadas isoladas de *S. stenophyllum* demonstraram maiores efeitos citotóxicos contra essas células tumorais.

Embora diversos estudos tenham sido conduzidos com polissacarídeos sulfatados de macroalgas marinhas utilizando diferentes linhagens celulares tumorais, não foi encontrado na literatura relatos da atividade desses polissacarídeos em linhagens celulares de glioma humano.

3.6 GLIOMAS

Gliomas são tumores cerebrais originados das células da glia. Essas células constituem cerca de metade de volume do cérebro e possuem papel importante na sustentação e nutrição dos neurônios. Os três principais tipos celulares que compõem esse tecido são: astrócitos, oligodendrócitos e células de Schwann (ABTA, 2010).

Entre os tumores intracranianos os gliomas são os mais comuns. Apesar de diagnósticos modernos e diversos tratamentos, a média de sobrevida dos pacientes com o grau mais agressivo da doença não ultrapassa 15 meses. Além disso, o índice de recorrência após a remoção cirúrgica é elevado, visto que uma das

principais características de gliomas malignos é seu comportamento altamente invasivo (DEMUTH; BERENS, 2004).

Os gliomas são denominados de acordo com as células de origem, podendo ser astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas originados de células de astrócitos, oligodendrócitos e células ependimais, respectivamente. Há ainda os gliomas mistos, formados por mais de um tipo de célula (ABTA, 2010).

As linhagens utilizadas neste trabalho U373MG e U87MG são astrocitomas, ou seja, originadas de astrócitos. Os astrócitos são células que apresentam aspecto de estrela, com vários prolongamentos que se estendem de um corpo central. Esses prolongamentos estão em contato com capilares, axônios, sinapses e outras células gliais. As funções dos astrócitos estão relacionadas à manutenção das concentrações iônicas e de metabólitos em valores adequados com o funcionamento dos neurônios, além de constituírem com o endotélio dos capilares, a barreira hemato-encefálica, que controla a difusão entre o plasma e o interstício neuronal (LEVITAN; KACZMAREK, 2002).

Os astrocitomas são histologicamente classificados em graus (I a IV) de acordo com o nível de anormalidade. Os tumores de grau I e II são benignos e ditos de baixo grau. Já os tumores graus III e IV são também denominados astrocitoma anaplásico e glioblastoma multiforme, respectivamente, sendo considerados de alto grau. Os tumores de alto grau possuem capacidade extremamente particular de agressão e invasão, não respondendo efetivamente a nenhum outro tratamento que não seja a neurocirurgia (ABTA, 2010).

Aproximadamente 50% dos gliomas são glioblastomas, atingindo principalmente homens nas idades de 40 – 50 anos. Já os astrocitomas anaplásicos atingem principalmente jovens adultos. A causa desses tumores, bem como de outros tumores cerebrais é desconhecida, porém anormalidades nos cromossomos 10 e 17 podem ter um papel no desenvolvimento desses tumores (ABTA, 2010).

Os sintomas da presença do tumor são decorrentes do aumento de pressão no cérebro podendo ser: dores de cabeça, convulsões, perda de memória e alterações no comportamento. Em relação aos tratamentos utilizados, primeiramente é realizada a remoção cirurgica, seguida pela radioterapia. A quimioterapia também

pode ser utilizada logo após diagnóstico do tumor. Diversos medicamentos estão sendo investigados para tratar astrocitoma anaplásico e glioblastoma, porém a maioria deles possuem efeitos adversos (ABTA, 2010).

Sendo assim, a procura por novas substâncias com propriedades antineoplásicas e efeitos colaterais reduzidos torna-se necessário a fim de fornecer alternativas para o tratamento destas enfermidades.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESPÉCIE ESTUDADA E SEU POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO

A espécie estudada neste trabalho *Gayralia oxysperma* pertence a:

Super-Reino: Eucariota

Reino: Plantae

Sub-reino: Viridaeplantae

Filo: Chlorophyta

Classe: Ulvophyceae

Ordem: Ulvales

Família: Gayraliaceae

Gênero: *Gayralia*

Espécie: *Gayralia oxysperma* (Kützinger) K.L. Vinogradova ex Scagel *et al.*

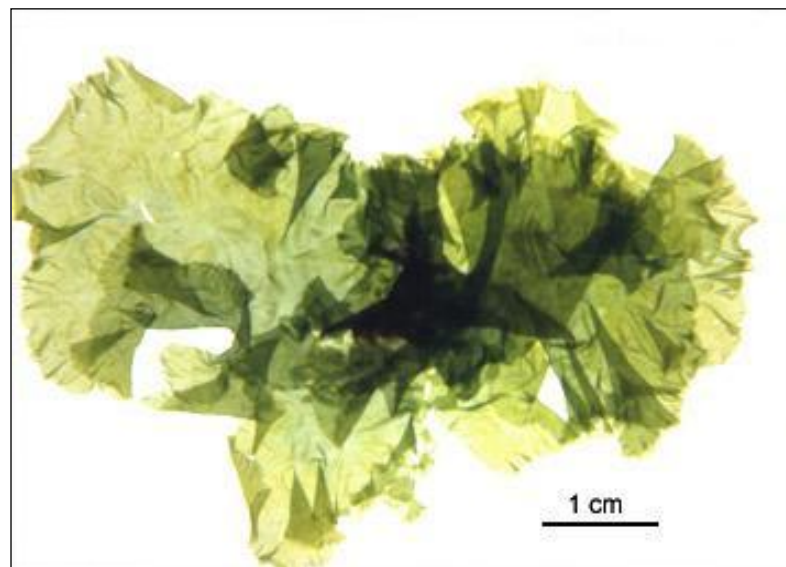


FIGURA 3 – ASPECTO GERAL DA CLORÓFITA *G. oxysperma*

FONTE: <<http://www.marevita.org/>>. Acesso em 20/01/2010.

4.2 COLETA E PROCESSAMENTO

Os exemplares de *Gayralia oxysperma* foram cultivados na baía de Paranaguá, litoral do Paraná, e coletados em junho de 2008, sendo identificados pelo Dr. Eurico Cabral de Oliveira (Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo). Os exemplares foram cedidos pela Dr.^a Franciane M. Pellizzari (Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade Estadual de Filosofia, Ciências e Letras de Paranaguá).

A alga verde *G. oxysperma* foi lavada em água doce, seca em estufa a 25 – 30°C e moída em moinho de faca (Wiley Mill). A alga seca e moída foi submetida ao processo de extração descrito a seguir.

4.3 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA ALGA *Gayralia oxysperma*

A alga seca e moída foi submetida à extração aquosa (5% m/v) em banho-maria (80°C) sob agitação mecânica por 4 horas. Os extratos aquosos foram centrifugados (7700 x g por 20 minutos), obtendo-se um sobrenadante (submetido à redução de volume em evaporador rotatório sob pressão reduzida) e um resíduo. Ao sobrenadante foi adicionado etanol (3:1 v/v) e acetato de potássio (0,5% m/v) para precipitação dos polissacarídeos. A amostra foi mantida no freezer por 24 horas para a precipitação do material que se manteve suspenso. Os polissacarídeos precipitados foram separados por centrifugação (7700 x g por 20 minutos), ressolubilizados em água destilada, dialisados contra água destilada (membrana de 12-14 kDa), dialisados contra solução salina (NaCl 0,5M) (para troca dos íons potássio), dialisados novamente contra água destilada e liofilizados dando origem à fração bruta denominada OX-1.

O resíduo da alga obtido após primeira extração foi submetido a quatro extrações aquosas seqüenciais, seguindo os mesmos procedimentos descritos acima, dando origem as frações brutas OX-2, OX-3, OX-4 e OX-5, que

correspondem à segunda, terceira, quarta e quinta extrações aquosas a 80°C, respectivamente.

4.4 DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH

Para realização da degradação controlada de Smith a fração de interesse (4 g) foi solubilizada em 300 ml de água destilada, sendo adicionada posteriormente 300 ml da solução de *m*-NaIO₄ 0,1M (metaperiodato de sódio), obtendo-se uma concentração final de 0,05M. Essa solução foi mantida no escuro por 72 horas, sob agitação mecânica a temperatura ambiente. Após esse período a solução foi tratada com 40 mL de etilenoglicol (para consumir o excesso de *m*-NaIO₄), dialisada contra água destilada (membrana de 6 – 8 kDa) para retirada do sal formado, e concentrada (em evaporador rotatório sob pressão reduzida). A amostra oxidada foi reduzida com NaBH₄ por 20 horas a temperatura ambiente, neutralizada com ácido acético, dialisada e liofilizada (GOLDSTEIN *et al.*, 1965).

A fração oxidada foi submetida ao processo de degradação controlada de Smith, através da hidrólise ácida parcial com TFA 1M (10 mg de polissacarídeos/ mL de TFA 1M) por 20 horas a temperatura ambiente, sob agitação. A amostra foi neutralizada, dialisada contra água destilada (membrana de 6 – 8 kDa) e liofilizada (FURNEAUX; STEVENSON, 1990). A fração resultante foi identificada com adição da letra “S” (Smith) ao nome da fração original.

4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

4.5.1 Carboidratos totais

As dosagens de carboidratos totais foram realizadas através do método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), utilizando-se como padrão a ramnose (solução de 100 µg/mL). O método apresenta linearidade entre 10 – 50 µg de açúcar. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 480 nm.

4.5.2 Proteínas totais

As dosagens de proteínas totais foram realizadas pelo método de Lowry *et al.* (1951) utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteu. O método apresenta linearidade entre 5 – 100 µg de proteína. O padrão utilizado foi uma solução 1 mg/mL de BSA (albumina de soro bovino). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 660 nm.

4.5.3 Grupos sulfato

Os teores de sulfato foram determinados pelo método de Dodgson e Price (1962), usando como reagente a mistura gelatina-bário. Primeiramente foi realizada a hidrólise total dos polissacarídeos com HCl 1M por 5 horas a 105°C, para liberação dos grupamentos sulfato. O sulfato em contato com o íon bário (adicionado na solução como BaCl₂) forma um composto insolúvel (BaSO₄) que se mantém em suspensão devido a presença da gelatina (Oxoid), sendo sua turbidez medida em espectrofotômetro. O padrão utilizado foi uma solução de sulfato de sódio

(100 µg/100 µL) e as leituras realizadas no comprimento de onda de 360 nm. O método apresenta linearidade entre 20 – 200 µg de sulfato.

4.5.4 Ácidos Urônicos

As dosagens de ácidos urônicos foram realizadas pelo método descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), utilizando o *m*-hidroxibifenila. O padrão utilizado foi uma solução de glucoronato de sódio (100 µg/mL). O método apresenta linearidade entre 1 – 38 µg de ácidos urônicos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 525 nm.

4.5.5 Polarimetria

A determinação da rotação óptica específica ($[\alpha]_D^{25^\circ}$) das amostras foi realizada na concentração de 0,2 g% em solução aquosa a temperatura de 25 °C, utilizando cubetas de 10 cm de comprimento em polarímetro RUDOLPH RESEARCH, modelo Autopol III, no comprimento de onda de 589,3 nm.

4.6 MÉTODOS HIDROLÍTICOS

4.6.1 Hidrólise ácida total

Para determinação da composição monossacarídica dos polissacarídeos da macroalga *G. oxysperma*, as frações foram submetidas à hidrólise ácida total (1 – 2 mg) com TFA 1M por 4 horas a 100°C. Após essa etapa, os monossacarídeos obtidos foram reduzidos com NaBH₄ por 15 horas a temperatura ambiente e neutralizados com ácido acético diluído, sendo seu excesso transformado em ácido

bórico. Foi realizada co-destilação com metanol (3x) para remoção do ácido bórico na forma de borato de metila. Os alditóis foram acetilados com anidrido acético (1 mL) em estufa a 120°C por 1 hora. Os acetatos de alditóis foram analisados por CLG-EM.

4.7 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DOS POLISSACARÍDEOS

4.7.1 Carboxi-redução

O processo de carboxi-redução foi realizado com as subfrações purificadas por cromatografia de troca iônica de acordo com os métodos de Taylor e Conrad (1972) e Anderson e Stone (1985). Através deste método os ácidos urônicos presentes no polímero são convertidos a ésteres pela carbodiimida [1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida] (CMC), podendo desta forma ser reduzidos (com NaBH₄ ou NaBD₄) a seu respectivo açúcar neutro.

Primeiramente as frações foram solubilizadas em tampão MES 0,2M (pH 4,75). Em seguida foi adicionado vagarosamente carbodiimida (CMC) na proporção de 1,0 mM de carbodiimida:50 µEq de carboxila. Após agitação por 1 hora, o pH foi ajustado para 7,0 pela adição de tampão TRIS 2,0 M e adicionou-se NaBD₄ até a obtenção de uma solução 2M. Após 12 horas a 30°C, a solução foi neutralizada com ácido acético (1:1 v/v), dialisada contra água destilada (membrana 6 – 8 kDa) e liofilizada.

As frações e massas utilizadas para a realização da carboxi-redução foram: OX-6Sb=100 mg e OX-6Sc= 140 mg. As frações obtidas após carboxi-redução foram identificadas pela adição da letra “R” (carboxi-reduzido) aos nomes originais das mesmas.

4.7.2 Dessulfatação por tratamento solvolítico

O processo de dessulfatação foi conduzido com os polissacarídeos na forma de sal de piridínio. Para formação deste sal, as frações polissacarídicas foram solubilizadas em água destilada (30 mg/mL) sendo posteriormente adicionada resina catiônica DOWEX 50x8 na forma H^+ , sob agitação magnética a temperatura ambiente por 30 minutos. O pH do sobrenadante foi medido devendo estar entre 1,0 – 2,0. Após filtração para separação da resina, os filtrados foram neutralizados em capela com piridina (até pH 7,0) e liofilizados (NAGASAWA; INOUE; TOKUYASU, 1979).

A solvólise foi realizada com os polissacarídeos na forma de sal de piridínio. Para o processo de solvólise as frações foram solubilizadas em uma mistura de dimetilsulfóxido:metanol:piridina na proporção de 89:10:1 (v/v), respectivamente, respeitando a relação de 10 mg de polissacarídeo para 3 mL da mistura (NAGASAWA; INOUE; TOKUYASU, 1979). As soluções foram mantidas em estufa a 100°C durante 4 horas. Após resfriamento, as frações foram dialisadas contra água destilada e liofilizadas.

As frações e massas utilizadas para a dessulfatação foram: OX-6Sb=45 mg e OX-6Sc=50 mg. As frações obtidas após dessulfatação foram identificadas pela adição da letra “D” (dessulfatado) aos nomes originais das mesmas.

4.8 ANÁLISE DE METILAÇÃO

Para realização da metilação as frações polissacarídicas foram inicialmente reduzidas com $NaBH_4$ e dialisadas contra solução de trietilamina (5% m/v) durante 15 horas, visando obter polissacarídeos solúveis no solvente aprótico dimetilsulfóxido (DMSO), que compõe o meio reacional da metilação. Os polissacarídeos foram recuperados na forma de sal de trietilamônio e liofilizados (STEVENSON; FURNEAUX, 1991).

O processo de metilação dos polissacarídeos, na forma de sal de trietilamônio, foi realizado de acordo com o método de Ciucanu e Kerek (1984). Os polissacarídeos foram solubilizados em DMSO (2 mL para cada 15 mg de polissacarídeo), adicionado posteriormente NaOH pulverizado (aproximadamente 30 mg) e mantido sob agitação mecânica vigorosa durante 30 minutos. Após esse tempo, foi adicionado iodometano (ICH_3) (0,2 mL para cada 15 mg de polissacarídeo) sob agitação mecânica vigorosa por mais 30 minutos. Esse processo de adição de NaOH e ICH_3 foi repetido mais duas vezes, completando-se a primeira etapa de metilação. As frações foram submetidas a três etapas de metilação, sendo após cada etapa, submetidas à diálise contra água destilada e liofilização.

Para a análise dos produtos metilados as frações foram submetidas à hidrólise com ácido fórmico 45% durante 16 horas a 100°C , em seguida reduzidos com NaBD_4 por 12 horas, neutralizados com ácido acético (1:1 v/v), co-distilados com metanol e acetilados com anidrido acético (1 mL) por 1 hora a 120°C . Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por CLG-EM.

4.9 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

4.9.1 Cromatografia de troca iônica

A fração degradada de Smith foi submetida ao fracionamento em cromatografia de troca aniônica em coluna contendo DEAE-Sephacel na forma Cl^- (volume 500 mL). Primeiramente a fração foi solubilizada em água destilada e adicionada à coluna com eluição lenta de água para completa interação do polissacarídeo com gel. A fração polissacarídica foi eluída com água destilada e concentrações crescentes de NaCl (0,5M; 1M; 1,5M; 2M e 3M).

Para o refracionamento da fração OX-6Sc foi utilizada uma coluna analítica de DEAE-Sephacel (volume 20 mL). A fração polissacarídica foi eluída com água destilada e concentrações crescentes de NaCl em intervalos menores (0,4M; 0,6M; 0,8M; 1M; 1,2M; 1,4M; 1,6M; 1,8M; 2M).

As eluições foram monitoradas pelo teste colorimétrico do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). As subfrações obtidas foram concentradas em rotaevaporador, dialisadas contra água destilada e liofilizadas. As subfrações resultantes foram identificadas com adição de letras ao nome da fração original: na fração eluída com água destilada foi adicionado “w” (*water*) e nas frações eluídas com NaCl foram adicionadas as letras “a”, “b”, “c”, e assim por diante, conforme aumento da concentração de NaCl.

4.9.2 Cromatografia Líquido-Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CLG-EM)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas em um cromatógrafo da marca VARIAN 3800, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 μ m) DB-225 MS (Durabond), e um espectrômetro de massa do tipo *Ion Trap*, marca Varian Saturn 2000R. A temperatura do injetor foi de 250 °C e a temperatura inicial do forno foi de 50°C, seguido de aumento gradual de 40 °C por minuto, até 220 °C para acetato de alditol, e 210 °C para alditol acetato parcialmente metilado, mantendo-se constante a partir de 25 e 30 minutos, respectivamente. O gás de arraste utilizado foi o hélio com fluxo de 1,0 mL/min. Os espectros de massas foram obtidos por impacto de elétrons de 70 eV, com *m/z* (relação massa/carga) de 80 a 220 e 50 a 350 (para as frações carboxi-reduzidas com NaBD₄). Os cromatogramas foram analisados e integrados em *software* Saturn Workstation 5.1. Esse método foi utilizado para quantificação relativa de acetatos de alditóis e acetatos de alditóis permetilados, sendo identificados por meio de seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons (JANSSON *et al.*, 1976) e comparados com padrões produzidos por Sasaki *et al.* (2005).

4.9.3 Cromatografia de Gel Permeação (HPSEC-MALLS)

Para análise de homogeneidade e determinação da massa molecular ponderal média (Mw) foram preparadas soluções dos polissacarídeos na concentração de 1 mg/mL em solução de nitrito de sódio (NaNO_3 0,1M) contendo azida de sódio (200 ppm) dissolvidas em água milliQ. As soluções obtidas foram filtradas em membranas MILLIPORE (acetato de celulose) de 0,22 μm .

As análises foram realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração (IR) diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WAYTT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP, com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Utilizaram-se quatro colunas de gel permeação WATERS, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 (Colunas Ultrahydrogel™ 2000, 500, 250 e 120, respectivamente) em série. O eluente utilizado foi uma solução de nitrito de sódio (NaNO_3 0,1M) contendo azida de sódio (200 ppm), pressão de 920 psi a 20°C.

Para determinação da massa molecular ponderal média (Mw) das frações homogêneas foram preparadas soluções de 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg das amostras em 1 mL de nitrito de sódio (NaNO_3 0,1M) e azida de sódio (200 ppm), previamente filtradas em membrana Millipore 0,45 μm . As massas moleculares foram determinadas a partir do perfil de eluição e valores de dn/dc . Os dados foram analisados através do *software* ASTRA (WAYTT TECHNOLOGY).

4.10 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

4.10.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear foram realizadas em espectrômetro da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, em tubos de 5 mm de diâmetro. Os deslocamentos químicos, expressos em ppm, foram determinados utilizando acetona como padrão interno, tanto para as análises de ^{13}C (31,45 ppm) quanto para ^1H (2,225 ppm). As análises foram realizadas na temperatura de 70°C.

4.10.1.1 Técnicas de RMN Monodimensionais

a) Ressonância Magnética Nuclear de Carbono –13 (RMN de ^{13}C)

Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos na frequência base de 100,16 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, sendo feitas de 4.000 – 70.000 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos. As amostras foram solubilizadas em D_2O , na concentração de aproximadamente 80 mg/mL, pH 7.

b) Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN – ^1H)

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos na frequência base de 400,13 MHz, sendo necessário promover a troca dos hidrogênios das hidroxilas por deutério e a completa remoção das moléculas de água presentes, através da dissolução das frações em D_2O , congelamento e liofilização (sendo esse processo foi repetido por

no mínimo por três vezes), com a finalidade de diminuir a intensidade do sinal relativo ao hidrogênio ligado a oxigênio, o qual prejudica a qualidade do espectro obtido. As amostras foram solubilizadas em D₂O pura na concentração de aproximadamente 30 mg/mL, pH 7.

4.10.1.2 Técnicas de RMN Bidimensionais

a) HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy*)

Através desta técnica heteronuclear foi possível determinar quais átomos de hidrogênio (¹H) estão ligados aos respectivos átomos de carbono (¹³C) a partir de sinais de ¹³C conhecidos ou de ¹H já determinados.

As condições de aquisição dos espectros de HSQC utilizadas foram conforme descritas no manual da Bruker. A resolução dos espectros foi de 1024 (F2) x 512 (F1) K, com janela espectral de 4085 (F2) x 15923 (F1) Hz.

4.11 ATIVIDADE ANTITUMORAL *in vitro* DAS HETERORAMNANAS DE *G. oxysperma*

4.11.1 Linhagens celulares utilizadas

Os ensaios de atividade antitumoral foram realizados em células tumorais de glioma humano das linhagens U373MG (astrocitoma grau III) e U87MG (glioblastoma grau IV). As linhagens celulares foram cedidas pela Prof.^a Mari Cleide Sogayar (Laboratório de Biologia Celular e Molecular; Núcleo de Terapia Celular – NUCEL) da Universidade de São Paulo (USP).

As células foram cultivadas em meio DMEM alta glucose com 10% de soro fetal bovino (SFB) e gentamicina em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

4.11.2 Preparação das frações polissacarídicas para o ensaio biológico

Inicialmente foi preparada uma solução estoque de 5 mg/mL em água miliQ das frações de interesse. A solução foi filtrada em filtro estéril de 0,22 µm em fluxo laminar para esterilização das amostras. Foi realizada a dosagem de açúcares totais das frações filtradas de acordo com Dubois *et al.* (1956) para ajuste das concentrações de polissacarídeos desejadas. As concentrações utilizadas para os ensaios de viabilidade celular foram de 10, 100 e 1000 µg/mL de polissacarídeos dissolvidos em meio de cultura.

4.11.3 Determinação da viabilidade celular de células tumorais

Para determinação da atividade antitumoral das heteroramnanas de *G. oxysperma* foi utilizado o método *in vitro* do (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio) que determina a viabilidade celular através de ensaio colorimétrico (MOSSMANN, 1983).

As células foram contadas e foram plaqueadas 1×10^4 células/poço de cada linhagem em placa de 96 poços com volume final de 300 µL em cada poço. Deixou-se aderir por 24 horas em estufa a 37°C, 5% CO₂. O meio de cultura foi removido e adicionado os diferentes polissacarídeos nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL, sendo incubados por 24, 48 e 72 horas em estufa a 37°C, 5% CO₂. Após incubação, o meio de cultura foi removido e adicionado 300 µL da solução de MTT em HBSS (5 mg/mL) e incubado por 2 horas em estufa nas mesmas condições anteriores. Após esse período o MTT que não reagiu foi retirado e adicionado 300 µL de DMSO para dissolver os sais de formazan formados. A absorbância foi medida em leitor de microplacas (TECAN INFINITE M200) com filtro de 570 nm, utilizando como branco DMSO. A condição controle, representada como 100% de viabilidade celular, foi correspondente a células mantidas somente com meio de cultura.

Os ensaios foram realizados em quatro experimentos independentes em triplicata para cada concentração. As análises estatísticas foram realizadas através

do *software* GraphPad PRISM 5.0 sendo os resultados submetidos à análise de variância ANOVA (fator único) e teste de Tukey para comparação das médias. O nível de significância utilizado foi de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *G. oxysperma*

A macroalga verde *G. oxysperma* seca e moída (60 g) foi submetida à extração aquosa (5% m/v), sob agitação mecânica, a temperatura de 80°C (banho-maria) por 4 horas. Após centrifugação, o resíduo foi subsequenteiramente submetido a quatro extrações aquosas consecutivas nas mesmas condições da primeira, conforme fluxograma (FIGURA 4).

Os extratos aquosos, obtidos após cada extração foram centrifugados (7700 x g por 20 minutos), concentrados em rotaevaporador (sob pressão reduzida) e precipitados pela desidratação por etanol (3:1 v/v). Devido à turbidez dos sobrenadantes etanólicos foi adicionado acetato de potássio (0,5% m/v) para precipitação do material que se manteve suspenso. Os precipitados contendo os polissacarídeos foram separados por centrifugação (7700 x g por 20 minutos), ressolubilizados em água, dialisados seqüencialmente contra água destilada, solução de NaCl 0,5M (para troca dos íons potássio) e água destilada, sendo posteriormente liofilizados. Os sobrenadantes etanólicos foram descartados.

As frações brutas obtidas em cada extração foram denominadas OX-1, OX-2, OX-3, OX-4 e OX-5 de acordo com a seqüência de extração (FIGURA 4). A fração OX-1 foi destinada a outro projeto, não sendo utilizada neste estudo.

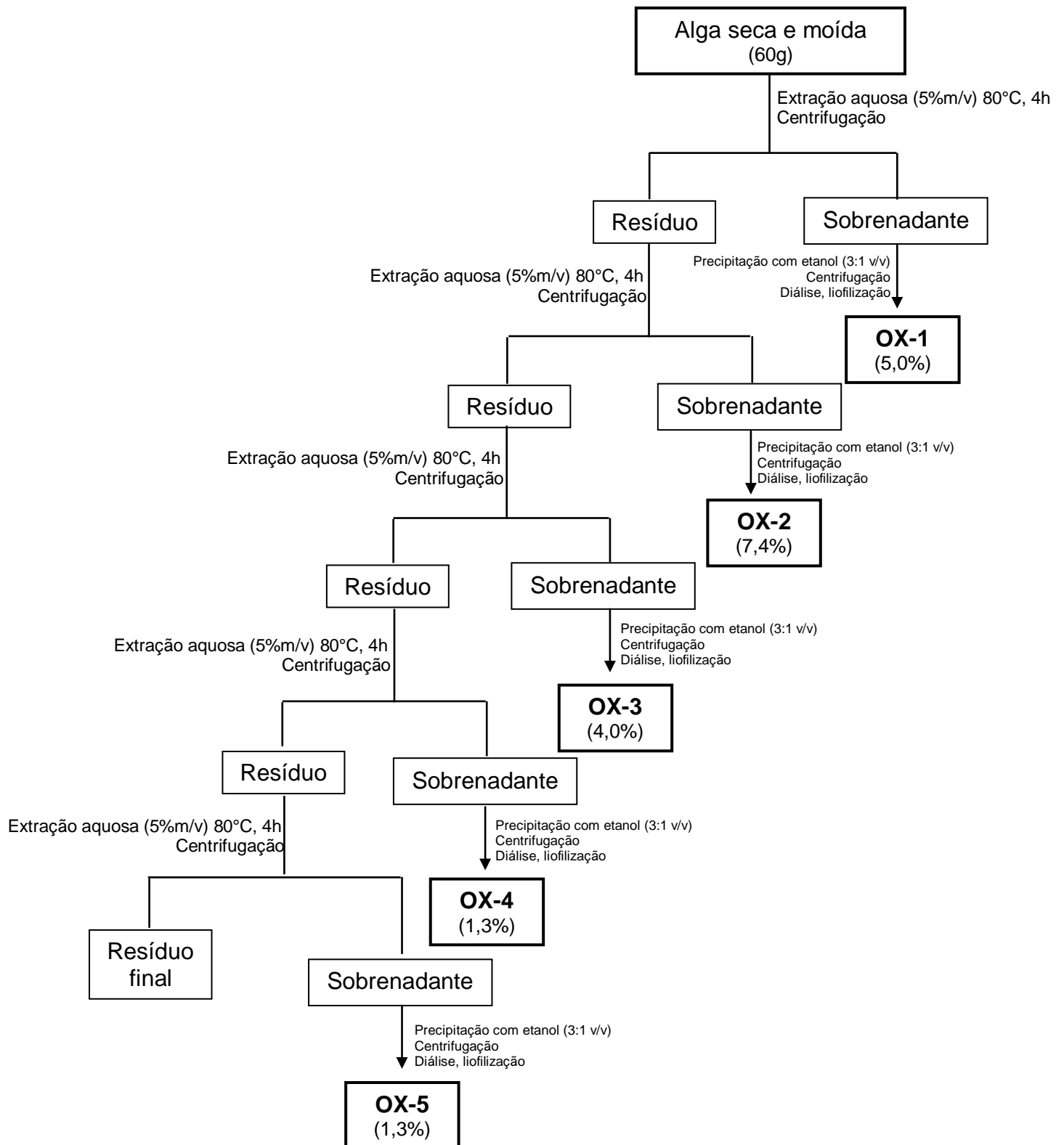


FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA MACROALGA VERDE *G. oxysperma*

NOTA: Rendimentos das extrações apresentados entre parênteses.

5.2 RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES BRUTAS

O rendimento individual das frações brutas de *G. oxysperma* foi variado (1,3 a 7,4%), sendo a fração majoritária a obtida pela segunda extração a quente (TABELA 1). Os rendimentos dos polissacarídeos obtidos nas extrações a frio e a quente desta mesma alga por Cassolato *et al.* (2008) variaram de 0,6 a 13,8%.

As análises de carboidratos totais das frações brutas de *G. oxysperma* apresentaram-se semelhantes, variando de 58,2 a 66,2% (TABELA 1). As frações apresentaram elevados teores de grupamentos sulfato (23,9 – 34,0%) e de ácidos urônicos (13,8 – 17,4%) caracterizando-se como polissacarídeos ácidos. Os teores de grupamentos sulfato e ácidos urônicos foram similares aos encontrados por Cassolato *et al.* (2008) nas frações submetidas as mesmas condições de extração citadas: 23,5 – 30,9% e 13,7 – 17,0%, respectivamente. No entanto, os teores de proteína nas frações obtidas neste trabalho foram menores: 0,9 – 2,4% em comparação com 2,0 – 6,0% encontrada por Cassolato *et al.* (2008).

Os valores de rotação óptica específica para todas as frações brutas foram negativos, visto que as frações são compostas de ramnose na configuração enantiomérica L-, e variaram de (-32,5) a (-37,0) o que corrobora com os resultados obtidos por Cassolato *et al.* (2008) que foram de (-29,0) a (-38,0).

TABELA 1 – RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES BRUTAS OBTIDAS DE *G. oxysperma*

Fração	Rendimento ^a (%)	Açúcar total ^b (%)	Sulfato ^c (%)	Ácido urônico ^d (%)	Proteína ^e (%)	[α] _D ^{25°}
OX-2	7,4	66,2	23,9	13,8	2,4	-32,5
OX-3	4,0	63,8	25,7	17,4	0,9	-34,0
OX-4	1,3	58,2	31,6	17,1	1,8	-35,5
OX-5	1,3	60,2	34,0	15,9	1,3	-37,0

^arendimento em relação a alga seca e moída (60g); ^bdeterminado pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.* 1956); ^cdeterminado pelo método de Dodgson e Price (1962); ^ddeterminado segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991); ^edeterminado segundo Lowry *et al.* (1951).

5.3 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES BRUTAS

Para a determinação dos constituintes monossacarídeos neutros presentes nas frações brutas, os polissacarídeos foram submetidos ao processo de hidrólise ácida total e analisados por CLG-EM. Conforme os resultados apresentados na Tabela 2, as frações são constituídas majoritariamente por ramnose (75,0 – 80,5 mol%), havendo ainda a presença de xilose (11,6 – 17,0 mol%), além de glucose e galactose em menores percentagens.

A análise de composição monossacarídica das frações brutas, bem como as análises químicas citadas acima, foram similares as encontrados por Cassolato *et al.* (2008), verificando assim a reprodutibilidade no processo de extração desta macroalga.

TABELA 2 – MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES BRUTAS DE *G. oxysperma*

Fração	Monossacarídeos (mol%) ^a			
	Rha ^b	Xyl	Glc	Gal
OX-2	77,7	11,7	7,4	1,7
OX-3	75,0	17,0	4,4	2,3
OX-4	80,5	12,9	4,2	tr.
OX-5	80,1	11,6	5,3	1,6

tr= traço; ^amonossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis;

^babreviatura dos monossacarídeos: Rha= ramnose, Xyl= xilose, Glc= glucose, Gal= galactose.

5.4 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DAS FRAÇÕES BRUTAS

As frações brutas foram submetidas à análise de cromatografia de exclusão estérica, acoplada a detectores de espalhamento de luz e de índice de refração, (HPSEC-MALLS-IR), a fim de verificar a homogeneidade das frações (FIGURA 5). Todas as frações apresentaram um perfil polidisperso e similar entre si, indicando a presença em todas as frações de polímeros com diferentes massas moleculares.

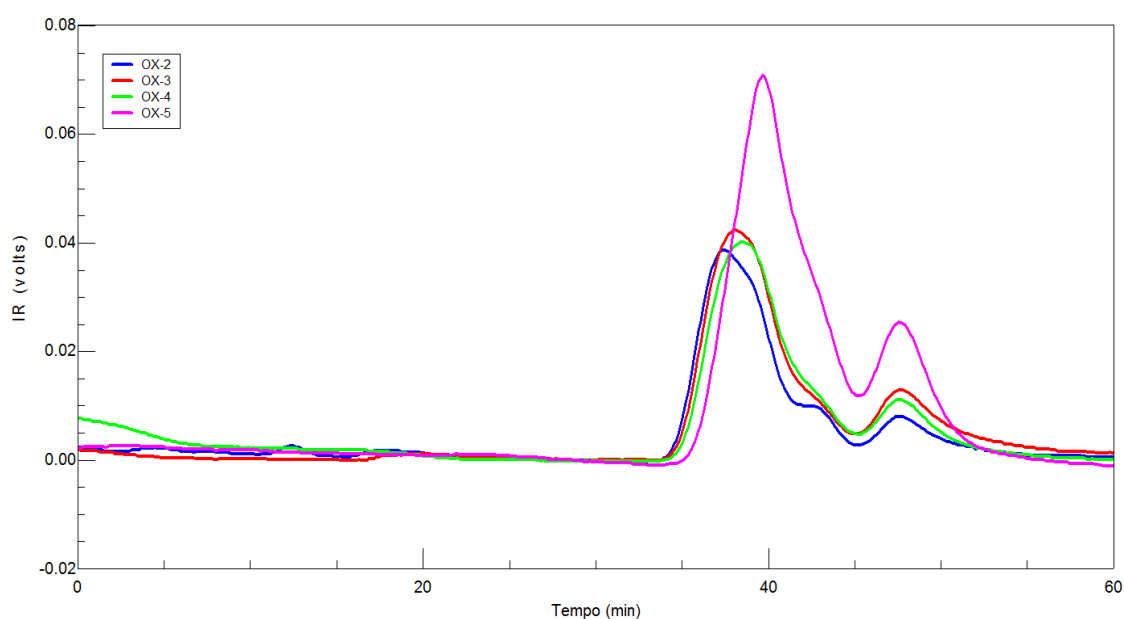


FIGURA 5 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DAS FRAÇÕES BRUTAS DE *G. oxysperma*

NOTA: IR= Índice de refração.

5.5 ANÁLISES DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES BRUTAS DE *G. oxysperma*

As análises de RMN mono e bidimensionais realizadas com as frações de *G. oxysperma*, foram comparadas com os assinalamentos descritos por Cassolato *et al.* (2008) para esta mesma espécie de alga.

Os espectros de RMN de ^{13}C das frações brutas da clorófita *G. oxysperma* são similares entre si e apresentam-se bastante complexos com grande número de sinais, refletindo diferentes padrões de substituição na molécula (FIGURA 6). Na região anomérica (98,0 – 103,3 ppm) os sinais são alargados em decorrência da viscosidade das amostras, bem como da sobreposição de sinais. Sinais de intensidade alta em 17,9 – 18,8 ppm correspondem ao grupo CH_3 da ramnose, confirmando os dados obtidos da composição monossacarídica, onde a ramnose é o principal açúcar encontrado nas frações brutas.

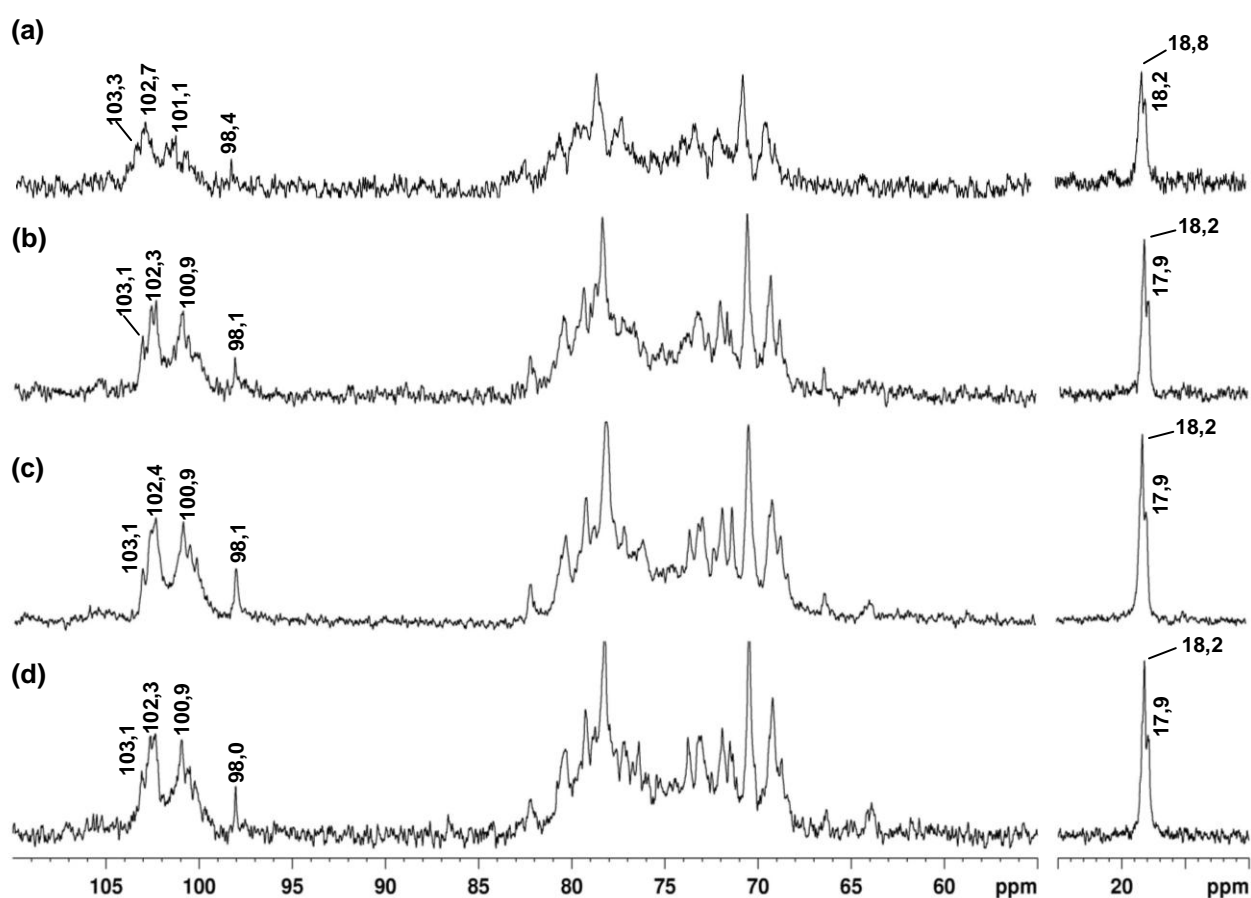


FIGURA 6 – ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES BRUTAS DE *G. oxysperma*: (a) OX-2 (b) OX-3 (c) OX-4 E (d) OX-5

NOTA: Solvente: D_2O (70°C, pH 7); acetona como padrão interno 31,45 ppm.

A partir das análises químicas e espectroscópicas realizadas, foi possível verificar que as frações brutas OX-2, OX-3, OX-4 e OX-5 apresentaram um grau de similaridade em termos de composição monossacarídica, perfil de homogeneidade e composição química, além de perfis similares nos espectros de RMN de ^{13}C . Partindo desses resultados e pelo propósito de se obter uma maior quantidade de material para a análise estrutural e biológica, todas as frações brutas foram reunidas gerando uma única fração que foi denominada OX-6.

5.6 DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH

A fração OX-6 foi submetida ao método de degradação controlada de Smith, visando à obtenção de fragmentos com menor massa molecular. O polissacarídeo, após oxidação com metaperiodato de sódio ($m\text{-NaIO}_4$) e redução com NaBH_4 (~70,0% de rendimento), foi submetido à hidrólise ácida parcial com TFA 1M a temperatura ambiente para a hidrólise das unidades oxidadas. O produto desta degradação contendo as unidades de açúcares resistentes à oxidação apresentou um rendimento de ~62,0% (TABELA 3). O produto da degradação controlada de Smith foi denominado com o acréscimo da letra “S” ao final de seu nome original (OX-6S), sendo referida também, neste trabalho, como “fração degradada de Smith”.

De acordo com estudos prévios (CASSOLATO *et al.*, 2008) durante o processo de degradação controlada de Smith, as unidades correspondentes aos terminais não redutores de galactose, xilose e ácido glucurônico 2-sulfatado são oxidadas, como representado na Figura 7. Unidades de xilose 3-ligadas, bem como ácido glucurônico 4-ligado 2-sulfatado (não representados na Figura 7) e a maioria das unidades de ramnose, não são susceptíveis à oxidação.

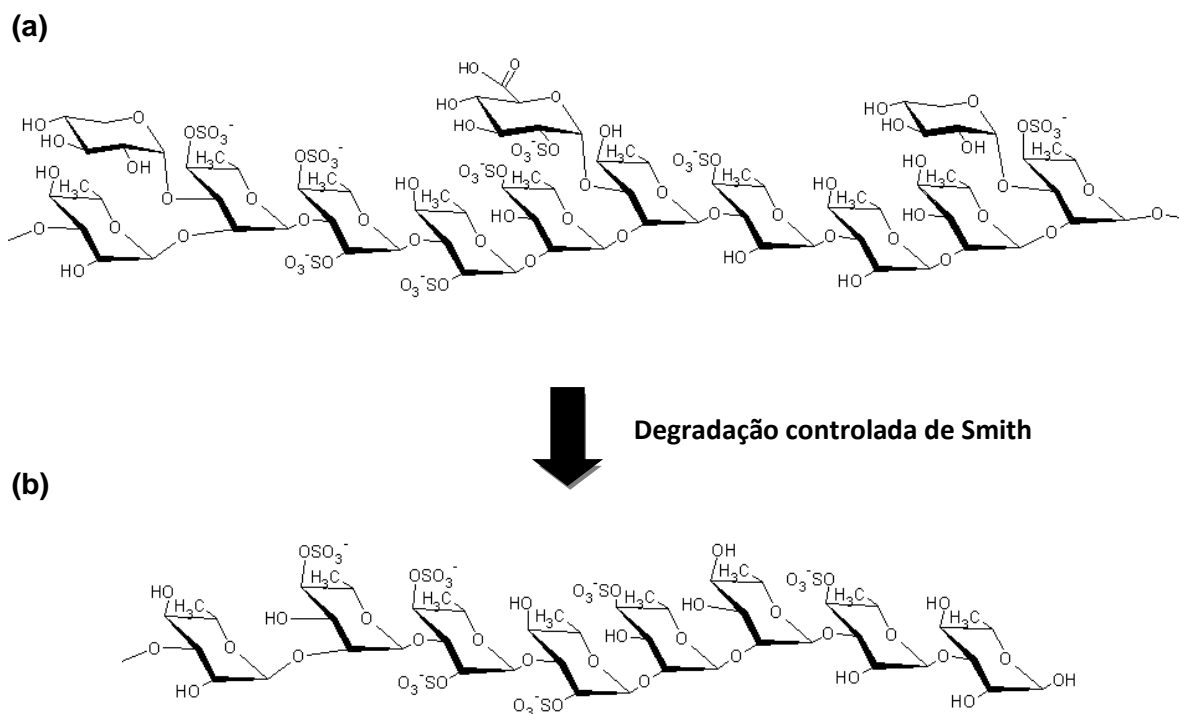


FIGURA 7 – ESTRUTURA TEÓRICA DE HETERORAMNANA SULFATADA ANTES (a) E APÓS DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (b)

5.6.1 Análises químicas e composição monossacarídica da fração degradada de Smith (OX-6S)

Em comparação com a fração nativa (OX-6) a fração submetida à degradação controlada de Smith (OX-6S) apresentou maior teor de grupamentos sulfato (25,7 \rightarrow 34,3%), diminuição nos teores de ácidos urônicos (17,4 \rightarrow 7,3%), bem como nos teores de xilose (17,0 \rightarrow 3,5 mol%), e oxidação total das unidades de galactose (TABELA 3). Adicionalmente, observa-se um aumento discreto de glucose (4,4 \rightarrow 7,7 mol%) e aumento nos teores de ramnose (75,0 \rightarrow 88,8 mol%), devido à diminuição relativa dos outros monossacarídeos. Portanto, o processo de degradação controlada de Smith realizado na fração bruta (OX-6) ocasionou a oxidação parcial de unidades de xilose, além de ácidos urônicos e oxidação total de galactose, verificando a susceptibilidade dessas unidades à oxidação. Ressalta-se ainda que unidades de ramnose susceptíveis à oxidação com metaperiodato de

sódio (unidades de ramnose 2-ligadas) podem estar presentes na fração nativa OX-6, as quais também teriam sido oxidadas.

TABELA 3 – ANÁLISES QUÍMICAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO SUBMETIDA À DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (OX-6S) E FRAÇÃO NATIVA (OX-6)

Fração	Rendimento ^a (%)	Açúcar total ^b (%)	Sulfato ^c (%)	Ácido urônico ^d (%)	Proteína ^e (%)	[α] _D ^{25°}	Monossacarídeos (mol%) ^f			
							Rha ^g	Xyl	Glc	Gal
OX-6		63,8	25,7	17,4	0,9	-34,0	75,0	17,0	4,4	2,3
OX-6S	61,6	50,0	34,3	7,3	0,5	-39,5	88,8	3,5	7,7	--

--- = não detectado; ^aem relação ao material submetido à degradação controlada de Smith; ^bdeterminado pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956); ^cdeterminado pelo método de Dodgson e Price (1962); ^ddeterminado segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991); ^edeterminado segundo Lowry *et al.* (1951); ^fmonossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis; ^gabreviatura dos monossacarídeos: Rha= ramnose; Xyl= xilose; Glc= glucose; Gal= galactose.

Esses resultados estão de acordo com estudos prévios (CASSOLATO *et al.*, 2008) onde foi demonstrado que a partir de uma fração homogênea (HPSEC-MALLS) foi obtido, após degradação controlada de Smith, um fragmento enriquecido de ramnose, altamente sulfatado, com baixos teores de ácidos urônicos, onde unidades de galactose e xilose foram completa e parcialmente oxidadas, respectivamente.

5.6.2 Análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS-IR da fração degradada de Smith (OX-6S)

A fração OX-6S submetida à análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS-IR apresentou um perfil de eluição assimétrico indicando heterogeneidade da amostra (FIGURA 8). Ressalta-se, no entanto, que o tempo de eluição da fração OX-6S foi maior que o da fração polissacarídica de origem (OX-6), decorrente da redução da massa molecular ocasionado pela oxidação dos pontos de ramificação, bem como unidades susceptíveis a oxidação com *m*-NaIO₄. A comparação entre os perfis de eluição das frações OX-6 e OX-6S pode ser verificado na Figura 9.

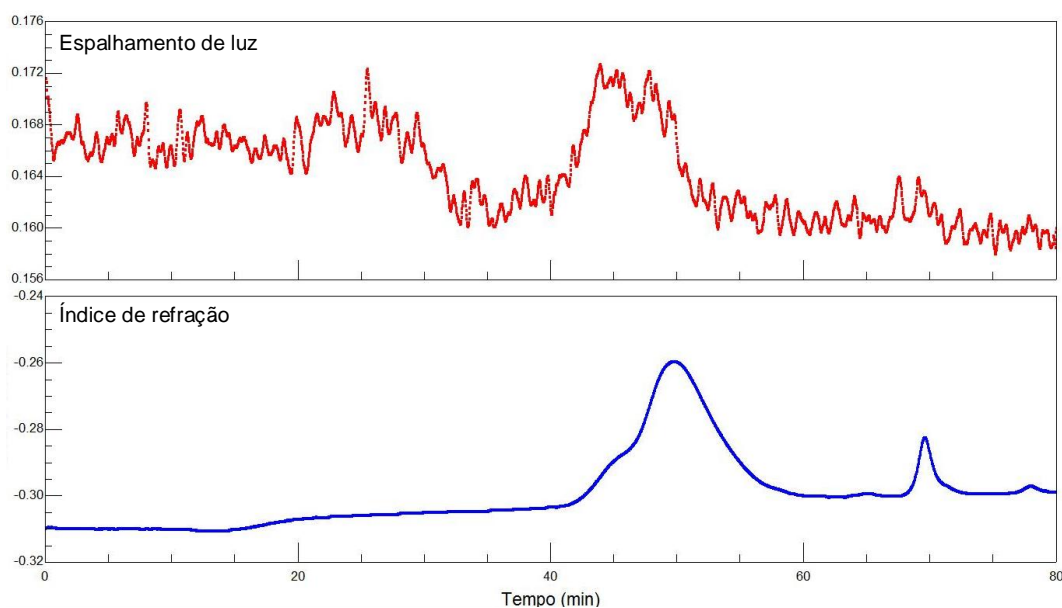


FIGURA 8 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DA FRAÇÃO SUBMETIDA À DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (OX-6S)

Nota: Picos após 60 minutos são correspondentes a presença de sais.

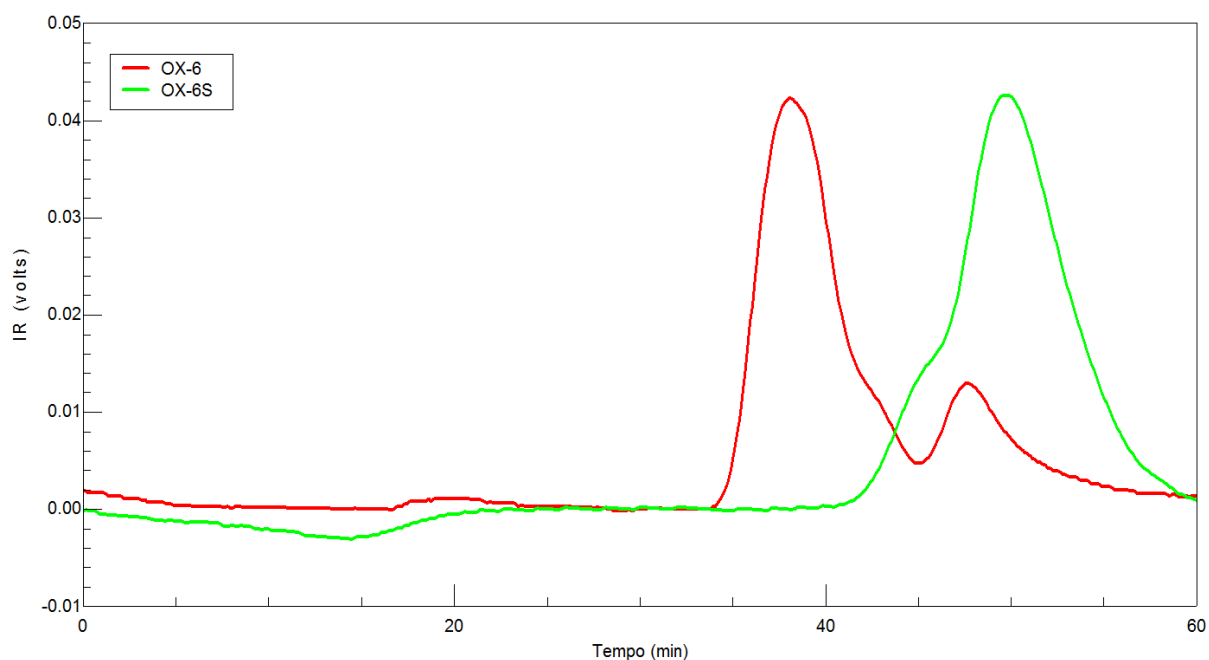


FIGURA 9 – COMPARAÇÃO DO PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DA FRAÇÃO SUBMETIDA À DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (OX-6S) E DA FRAÇÃO NATIVA (OX-6)

5.6.3 Análise de RMN de ^{13}C da fração degradada de Smith (OX-6S)

Os espectros de RMN de ^{13}C da fração OX-6S e sua fração nativa (OX-6) estão representados nas Figuras 10, 11 e 12 (Figuras 11 e 12 apresentam os espectros com as regiões ampliadas). Ambas as frações apresentaram espectros de RMN de ^{13}C com alta complexidade e sinais alargados devido, principalmente, ao padrão heterogêneo de sulfatação, além da presença de outros monossacarídeos, além da ramnose, como ácidos urônicos e xilose. Sinais anoméricos em 98,1 – 103,1 ppm (OX-6) e 98,0 – 103,7 ppm (OX-6S) foram atribuídos ao C-1 de unidades de α -L-ramnose, enquanto os de baixa intensidade em ~105,0 ppm correspondem a unidades monossacarídicas na configuração β , e poderiam corresponder a terminais não redutores de β -D-xilose, β -D-xilose 4-ligada ou unidades de β -D-ácido glucurônico (FIGURAS 10 e 11) (CASSOLATO *et al.*, 2008).

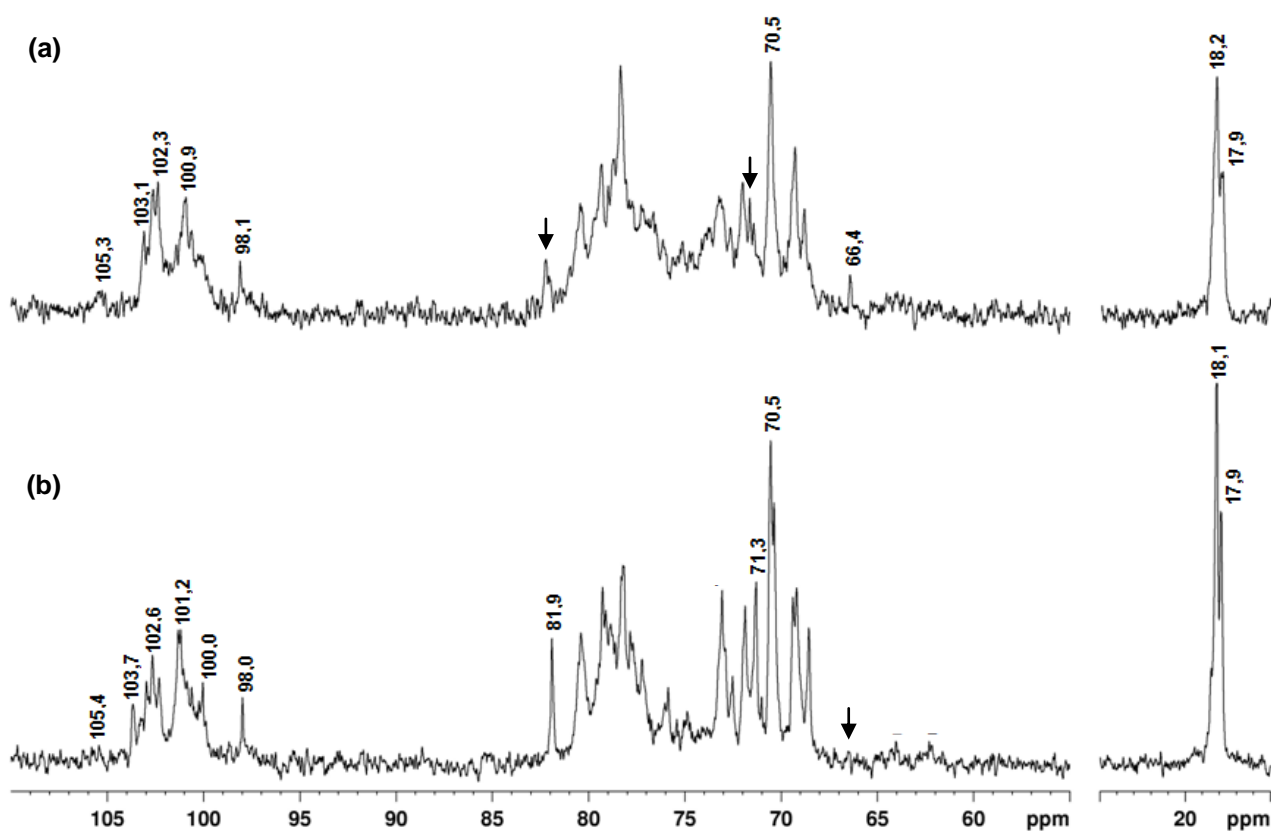


FIGURA 10 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO NATIVA OX-6 (a) E DA FRAÇÃO DEGRADADA DE SMITH OX-6S (b)

NOTA: Solvente: D_2O (70°C, pH 7); acetona como padrão interno 31,45 ppm.

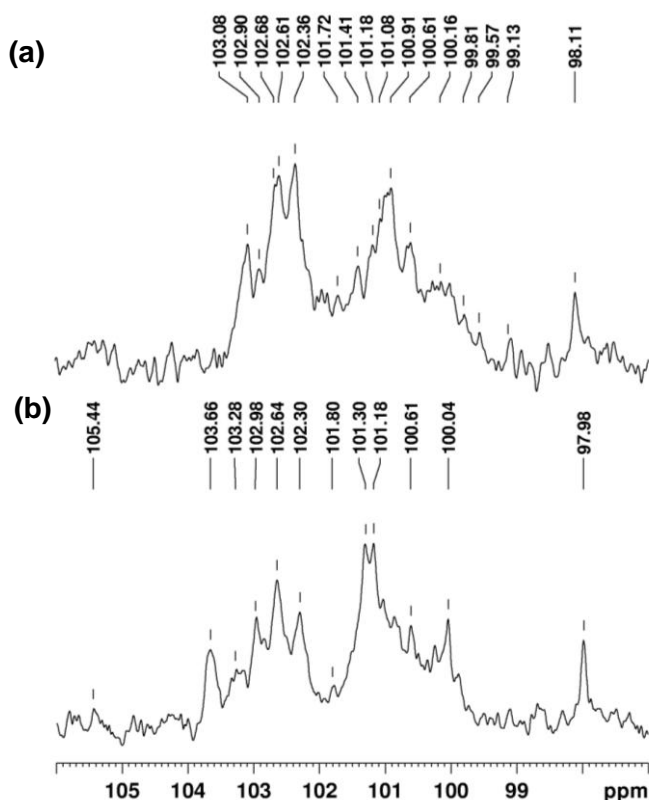


FIGURA 11 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DA REGIÃO ANOMÉRICA DAS FRAÇÕES OX-6 (a) E OX-6S (b)

NOTA: Solvente: D_2O (70°C, pH 7); acetona como padrão interno 31,45 ppm.

Ambos os espectros apresentam sinais de alta intensidade em 17,9 – 18,1 ppm que correspondem ao C-6 das unidades de ramnose. Observa-se também, a intensificação deste sinal na fração OX-6S, correspondente ao aumento de ramnose após degradação controlada de Smith (FIGURAS 10 e 12). O sinal em 70,5 ppm referente ao C-5 de unidades de ramnose demonstra que estas unidades apresentam configuração α , visto que sinais de C-5 de β -ramnose são observados na faixa de 72,3 – 73,4 ppm (BACKINOWSKY *et al.*, 1980; LIPKIND *et al.*, 1988).

Verifica-se, comparando os espectros, que após a degradação controlada de Smith houve o desaparecimento do sinal em 66,4 ppm correspondente ao C-5 de unidades de xilose como terminais não redutores, confirmando a oxidação dessas unidades. Nota-se também na fração OX-6S, o aumento do sinal em 81,9 ppm correspondente ao C-4 de unidades de ramnose 2-ligadas 4-sulfatadas, bem como aumento do sinal em 71,3 ppm correspondente ao C-2 livre de unidade de ramnose 3-ligadas e 3-ligadas 4-sulfatadas (FIGURAS 10 e 12).

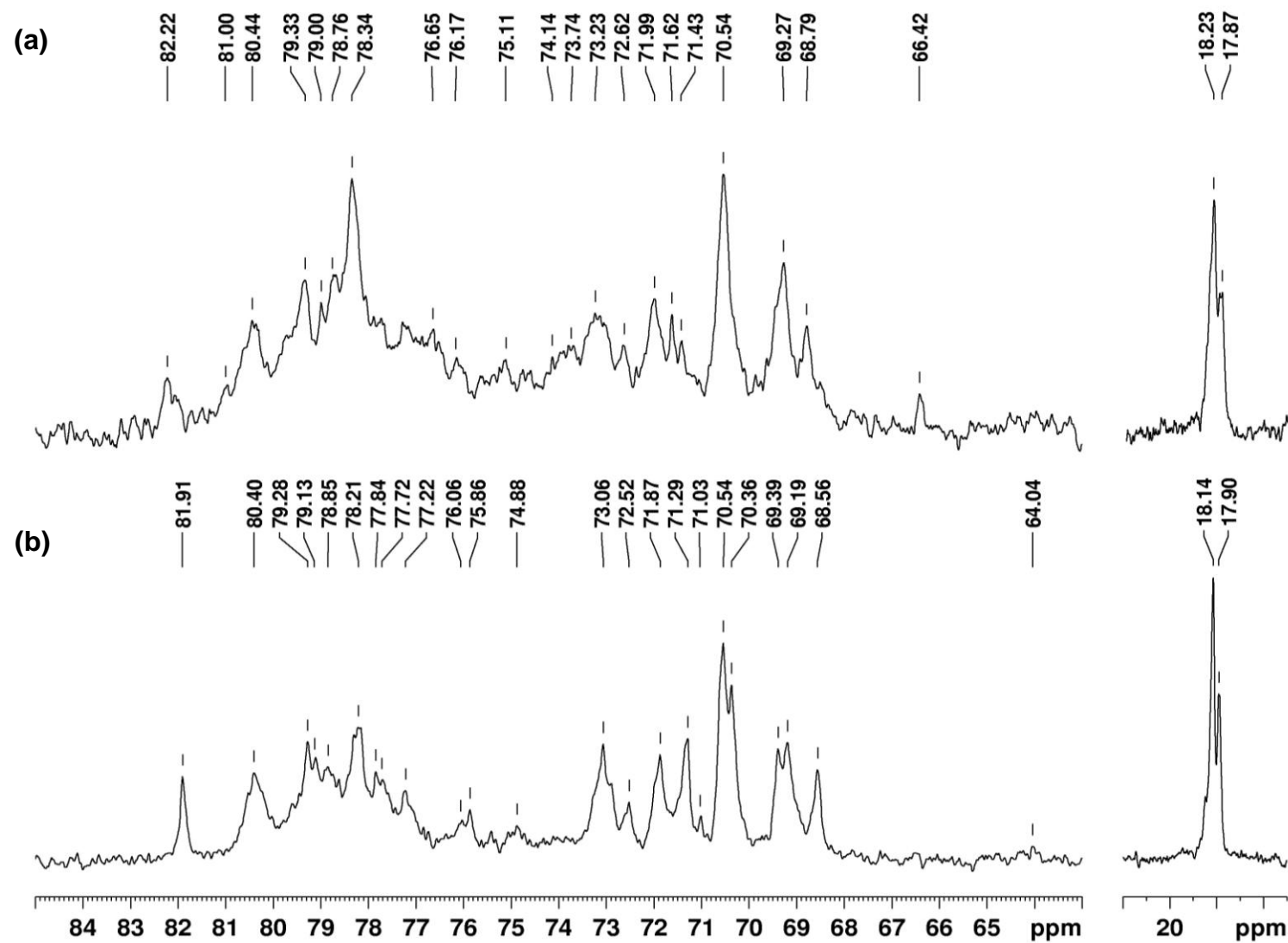


FIGURA 12 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DA REGIÃO DO ANEL DAS FRAÇÕES OX-6 (a) E OX-6S (b)

NOTA: Solvente: D_2O (70°C, pH 7); acetona como padrão interno 31,45 ppm.

A análise de RMN de ^1H da fração degradada de Smith (OX-6S) apresentou espectros com sinais na região anomérica de 5,04 – 5,80 ppm, atribuídos ao C-1 de unidades de α -ramnose (FIGURA 13). O sinal de alta intensidade em 1,38 ppm foi atribuído aos hidrogênios do C-6 das unidades de ramnose (não demonstrado).

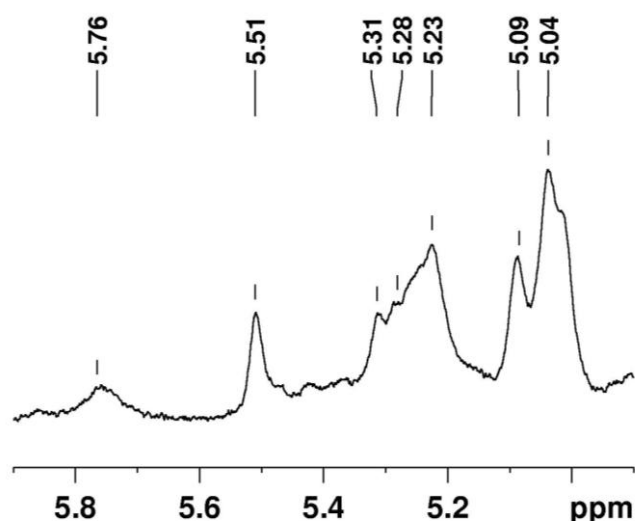


FIGURA 13 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA REGIÃO α -ANOMÉRICA DA FRAÇÃO OX-6S

NOTA: Solvente: D_2O (70°C, pH 7); acetona como padrão interno 2,225 ppm.

Após verificar a complexidade do produto de degradação controlada de Smith nas análises de RMN, e seu perfil heterogêneo na análise por HPSEC-MALLS-IR indicando a presença de mais de um polímero com diferentes massas moleculares, esta fração foi submetida ao processo de fracionamento por cromatografia de troca iônica a fim de se obter uma fração homogênea para os estudos estruturais.

5.7 FRACIONAMENTO DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (OX-6S)

A fração degradada de Smith OX-6S (2g) foi submetida à cromatografia de troca aniônica em coluna contendo DEAE-Sephacel na forma Cl^- , visando o fracionamento dos polissacarídeos. A fração OX-6S foi solubilizada em água destilada e submetida à coluna com eluição inicial de água destilada, passando a concentrações crescentes de NaCl (0,5 – 3M). As eluições foram monitoradas pelo teste colorimétrico do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). As frações foram denominadas conforme Figura 14.

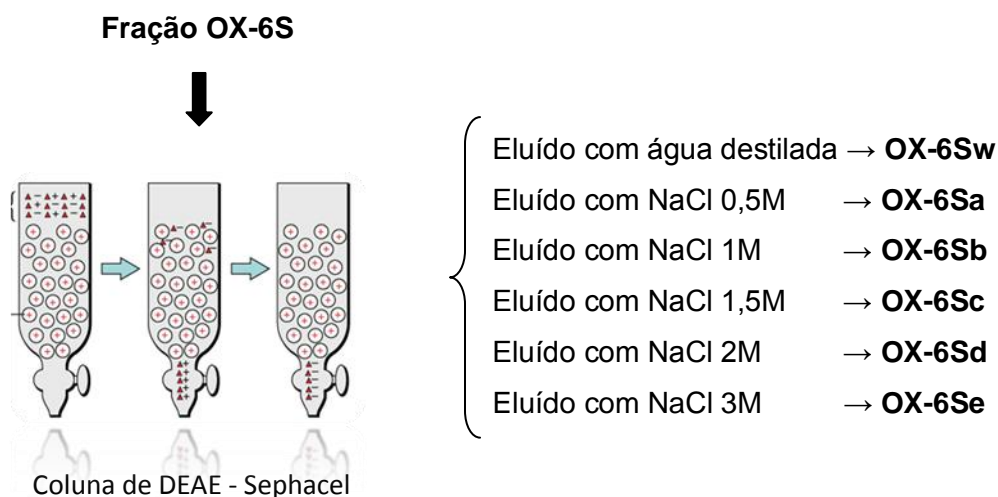


FIGURA 14 – ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO OX-6S EM CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

5.7.1 Análises químicas e composição monossacarídica das subfrações obtidas após cromatografia de troca iônica da fração OX-6S

O rendimento total obtido das frações recuperadas da cromatografia de troca iônica foi de 87,0% relativo à massa inicial aplicada na coluna. A fração de maior rendimento, representando 51,1% de todo o material recuperado, foi eluída com NaCl 1,5M (OX-6Sc), seguida da fração eluída com NaCl 1M (OX-6Sb) com 25,8%

de rendimento (TABELA 4). Todas as subfrações apresentaram teores elevados de grupamentos sulfato (22,1 – 41,1%), sendo que as duas frações de maior rendimento OX-6Sb e OX-6Sc possuem os maiores teores deste substituinte: 33,7 e 41,1%, respectivamente. As frações eluídas com concentrações crescentes de NaCl não tiveram um aumento gradativo nos teores de sulfato, bem como de ácidos urônicos, como seria esperado para esse tipo de polissacarídeo ácido. Isso pode ter sido devido à conformação da molécula, viscosidade da amostra, ou outros fatores que podem ter dificultado a interação do polissacarídeo com o gel.

Em relação à presença de ácidos urônicos a fração OX-6Sa, eluída com NaCl 0,5M, apresentou elevada percentagem deste monossacarídeo ácido (23,1%) quando comparada com as outras frações (5,1 a 6,9%). Outra particularidade da fração OX-6Sa foi o valor positivo para rotação óptica específica (+57,0), diferente dos valores encontrados para essas heteroramnanas. Observando a composição monossacarídica desta fração (TABELA 5), verifica-se a grande quantidade de glucose (37,7 mol%), o que pode explicar seu valor positivo para rotação óptica específica.

Os teores de proteínas foram variados entre as frações (0,4 – 14,1%), sendo a fração eluída com NaCl 3M (OX-6Se) a que apresentou os maiores teores (14,1%) e a fração de maior rendimento (OX-6Sc) as menores percentagens desse contaminante (0,4%).

TABELA 4 – RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS APÓS CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DA FRAÇÃO OX-6S

Subfração	Rendimento ^a (%)	Açúcar total ^b (%)	Sulfato ^c (%)	Ácido urônico ^d (%)	Proteína ^e (%)	[α] _D ^{25°}
OX-6Sw	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
OX-6Sa	6,7	29,2	24,5	23,1	2,1	+57,0
OX-6Sb	25,8	66,7	33,7	5,2	0,5	-57,5
OX-6Sc	51,1	60,0	41,1	6,9	0,4	-57,5
OX-6Sd	2,3	n.d.	22,1	5,4	2,6	n.d.
OX-6Se	0,6	n.d.	26,4	5,1	14,1	n.d.

n.d.= não determinado; ^arendimento em relação à fração submetida à cromatografia de troca iônica (2g); ^bdeterminado pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al*, 1956); ^cdeterminado pelo método de Dodgson e Price (1962); ^ddeterminado segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991); ^edeterminado segundo Lowry *et al*. (1951).

A Tabela 5 apresenta a composição monossacarídica das subfrações OX-6Sa – OX-6Se obtidas após cromatografia de troca iônica da fração OX-6S. As frações são constituídas por percentagens variadas de ramnose (52,2 – 95,0 mol%), xilose (2,0 – 10,8 mol%) e glucose (2,9 – 37,7 mol%). Além disso, observa-se a presença de galactose (8,7 mol%) apenas na fração OX-6Se, e baixas percentagens de manose e arabinose na fração OX-6Sa. As frações de maior rendimento OX-6Sb e OX-6Sc apresentam os maiores teores de ramnose e são as mais similares em relação à composição monossacarídica.

TABELA 5 – MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS APÓS CROMATOGRAPHIA DE TROCA IÔNICA DE OX-6S

Subfração	Monossacarídeos ^a (mol%)					
	Rha ^b	Xyl	Glc	Gal	Man	Ara
OX-6Sa	52,2	5,0	37,7	tr.	2,3	2,0
OX-6Sb	93,3	3,8	2,9	--	--	--
OX-6Sc	95,0	2,0	3,0	--	--	--
OX-6Sd	81,5	9,9	8,6	--	--	--
OX-6Se	70,6	10,8	9,8	8,7	--	--

--= não detectado; tr.= traço; ^amonossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis;
^babreviatura dos monossacarídeos: Rha= ramnose, Xyl= xilose, Glc= glucose, Gal= galactose, Man= manose, Ara= arabinose.

5.7.2 Análise de homogeneidade das frações de maior rendimento obtidas após cromatografia de troca iônica da fração OX-6S

As duas frações de maior rendimento obtidas após cromatografia de troca iônica (OX-6Sb e OX-6Sc) e a fração eluída com NaCl 0,5M (OX-6Sa), foram submetidas à análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS-IR, obtendo diferentes perfis de eluição (FIGURA 15). A fração OX-6Sb (eluída com NaCl 1M) apresentou um pico simétrico (FIGURA 15b), indicando que a fração encontra-se homogênea em relação a massa molecular, portanto sua massa molecular foi determinada. O valor de dn/dc calculado para essa fração de 0,138 foi utilizado para a determinação da sua massa molecular ponderal média que foi de 109,3 kDa.

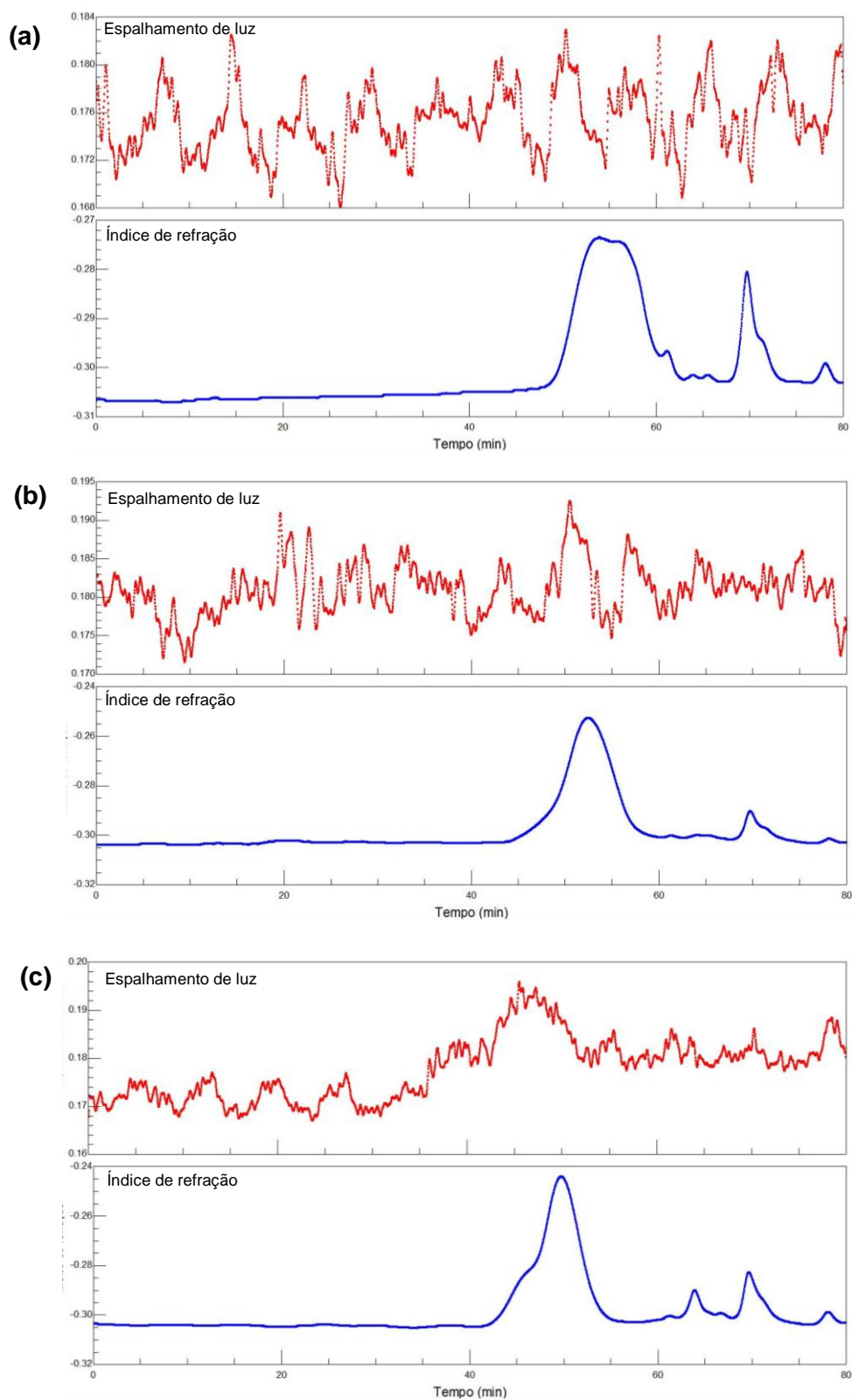


FIGURA 15 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DAS FRAÇÕES OX-6Sa (a), OX-6Sb (b) E OX-6Sc (c)

Nota: Picos após 60 minutos são correspondentes a presença de sais.

O produto de degradação controlada de Smith, obtido por Cassolato *et al.* (2008) a partir da heteroramnana homogênea ($M_w = 1519$ kDa), apresentou massa molecular de 109 kDa ($dn/dc = 0,251$). Esse mesmo valor de massa molecular foi obtido, no presente trabalho, para a fração OX-6Sb.

A fração OX-6Sa apresentou perfil de eluição heterogêneo em HPSEC-MALLS-IR indicando a presença de polímeros com massas moleculares diferentes (FIGURA 15a). O perfil cromatográfico de OX-6Sc não foi totalmente simétrico, com a presença de um ombro à esquerda (FIGURA 15c). Isto pode ser indicativo de heterogeneidade em relação à massa molecular ou alternativamente, a um polímero homogêneo, porém com a presença de agregados. Considerando estas duas possibilidades a fração OX-6Sc foi submetida a uma nova cromatografia de troca iônica (Item 5.8, p. 74).

5.7.3 Análise de RMN de ^{13}C das frações OX-6Sa, OX-6Sb e OX-6Sc

Os espectros de RMN de ^{13}C dos produtos de degradação controlada de Smith OX-6Sa, OX-6Sb e OX-6Sc estão apresentados na Figura 16. A fração OX-6Sa apresentou um espectro diferenciado, com um sinal principal na região anomérica em 98,0 ppm, e sinais de alta intensidade em 78,0; 72,6 e 73,2 ppm. Além disso, foi verificado o sinal em $\sim 175,0$ ppm (não demonstrado) correspondente aos grupos carboxílicos dos ácidos urônicos, de acordo com o alto teor deste monossacarídeo na fração. A fração OX-6Sa também apresentou alta percentagem de glucose (TABELA 5, p. 66). A ausência do sinal de C-6 livre de hexose nesse espectro, descarta a presença de unidades de α -D-glucopirranose ligadas (1 \rightarrow 4), os quais apresentam deslocamentos do C-1 ao C-6 em 99,9; 71,9; 73,1; 78,8; 71,5 e 60,5 ppm e em 99,5; 71,5; 73,2; 77,4; 71,2 e 60,6 ppm, respectivamente (DAIS; PERLIN, 1982; FREITAS, 2003). Visto seu perfil diferenciado, com elevados teores de ácidos urônicos e glucose, esta fração foi reservada para estudos posteriores.

As frações OX-6Sb e OX-6Sc apresentaram um espectro qualitativamente semelhante à fração de origem OX-6S (FIGURA 16).

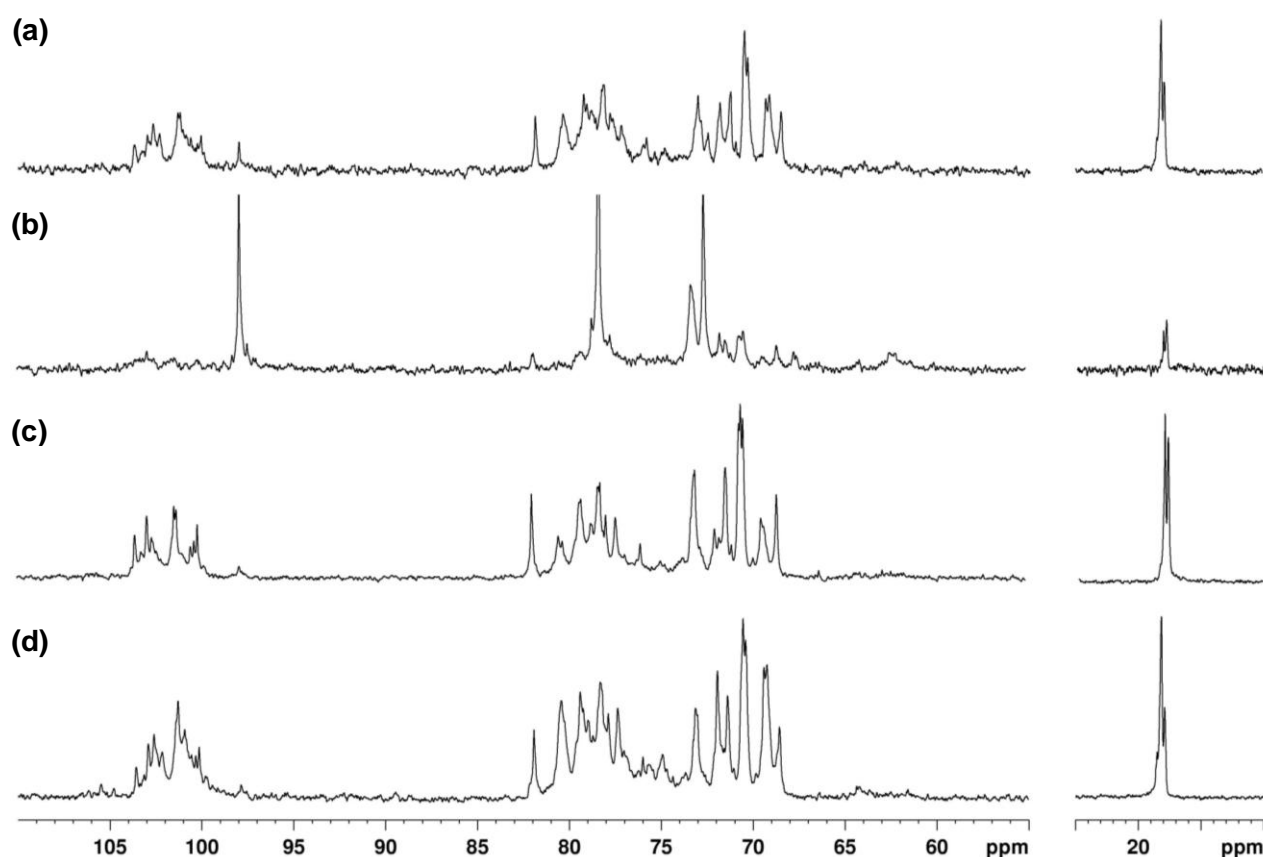


FIGURA 16 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO DE ORIGEM OX-6S (a) COM AS FRAÇÕES OX-6Sa (b), OX-6Sb (c) E OX-6Sc (d) OBTIDAS APÓS CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

NOTA: Solvente: D_2O (70°C, pH 7); acetona como padrão interno 31,45 ppm.

Os espectros de RMN de ^{13}C das frações OX-6Sb e OX-6Sc apresentam complexa região anomérica com a presença dos mesmos sinais, porém com intensidades diferentes (FIGURAS 16, 17 e 18). Nota-se que o espectro da fração OX-6Sc apresenta-se mais semelhante ao da sua fração de origem (OX-6S) quando comparado com a fração OX-6Sb (FIGURA 16).

Os espectros de RMN de ^{13}C das frações OX-6Sb e OX-6Sc apresentaram sinais anoméricos em 103,5; 102,9 e 102,6 ppm atribuídos a unidades de α -L-ramnose 3-ligadas e 3-ligadas 4-sulfatadas. Comparativamente, a intensidade do sinal em 102,6 ppm é maior que o sinal em 102,9 ppm na fração OX-6Sc, o qual poderia corresponder as unidades 3-ligadas sulfatadas em C-4 (FIGURA 17). Sinais anoméricos em 101,4 e 101,3 ppm correspondentes a unidades de ramnose 2-

ligadas (3,4-sulfatadas, 4-sulfatadas e 3-substituída) estão presentes em ambos os espectros. No espectro de RMN ^{13}C de OX-6Sc o sinal em 100,9 ppm também pode corresponder às unidades mencionadas anteriormente, ligadas em diferentes ambientes químicos. Adicionalmente, estes polissacarídeos contêm unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-2, C-2 e C-4, de acordo com a presença dos sinais anoméricos em 100,5; 100,3; 100,1 e 97,9 ppm.

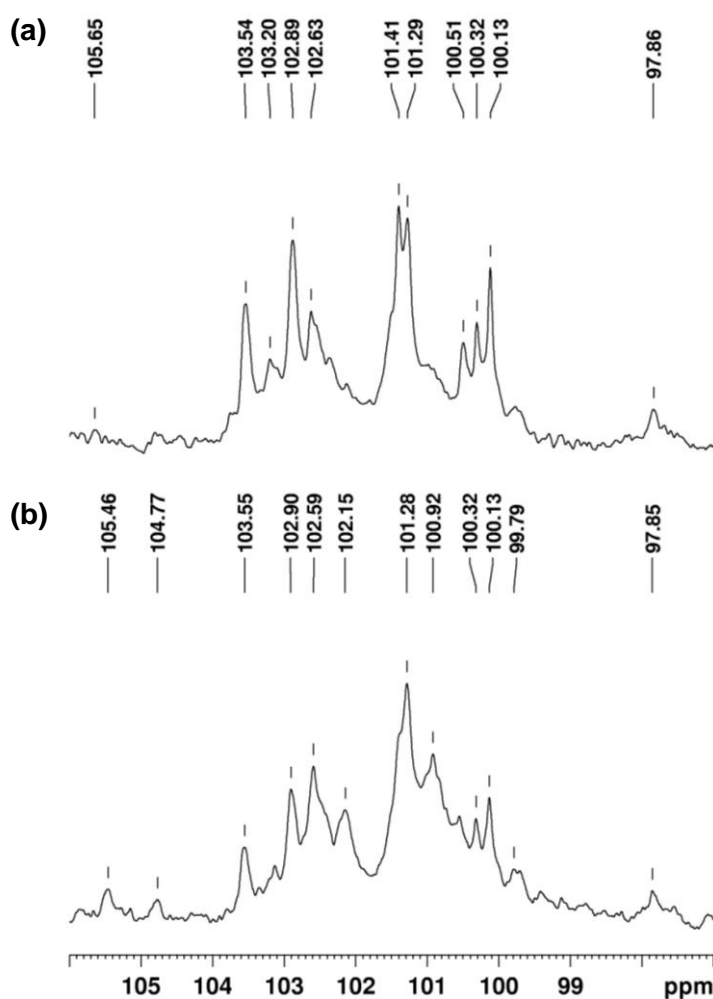


FIGURA 17 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DA REGIÃO ANOMÉRICA DAS FRAÇÕES OX-6Sb (a) E OX-6Sc (b)

NOTA: Solvente: D_2O (70°C, pH 7); acetona como padrão interno 31,45 ppm.

Na região dos carbonos do anel o sinal em 80,4 ppm apresenta-se mais intenso no espectro da fração OX-6Sc quando comparado com o espectro de OX-6Sb (FIGURA 18). Este sinal corresponde, pelo menos em parte, ao C-4 de unidades de ramnose 3-ligadas 4-sulfatadas, além de unidades de ramnose 2-ligadas 3,4-sulfatadas, cujo C-5 encontra-se em 69,4 ppm. A maior intensidade deste sinal no espectro de OX-6Sc em relação ao de OX-6Sb, indica que a fração OX-6Sc é constituída por maiores percentagens de ramnose 3-ligadas 4-sulfatadas e ramnose 2-ligadas 3,4-sulfatadas. O sinal em 81,9 ppm, correspondente ao C-4 de unidades de ramnose 2-ligadas 4-sulfatadas (C-5 em 68,6 ppm), também está presente em ambos os espectros.

Os espectros de RMN de ^{13}C das frações OX-6Sb e OX-6Sc apresentam sinais anoméricos de baixa intensidade em 105,5 ppm e 104,8 ppm (somente na fração OX-6Sc) atribuídos a unidades monossacarídicas na configuração β (ácido glucurônico) (FIGURA 17). A alta intensidade dos sinais em 18,1 e 17,9 ppm correspondentes C-6 unidades de ramnose, está de acordo com a predominância de ramnose constituindo os produtos de degradação controlada de Smith OX-6Sb e OX-6Sc (FIGURA 18).

Os espectros de RMN de ^1H das frações OX-6Sb e OX-6Sc e de sua fração de origem OX-6S estão apresentados na Figura 19. Sinais na região anomérica de 5,04 – 5,80 foram atribuídos a unidades de α -ramnose. Assim como os espectros de RMN de ^{13}C , os espectros de RMN de ^1H das frações OX-6Sb e OX-6Sc apresentaram diferenças nas intensidades de alguns sinais. Sinais em 5,13 e 5,28 ppm nos espectros de OX-6Sc foram mais intensos quando comparados com OX-6Sb.

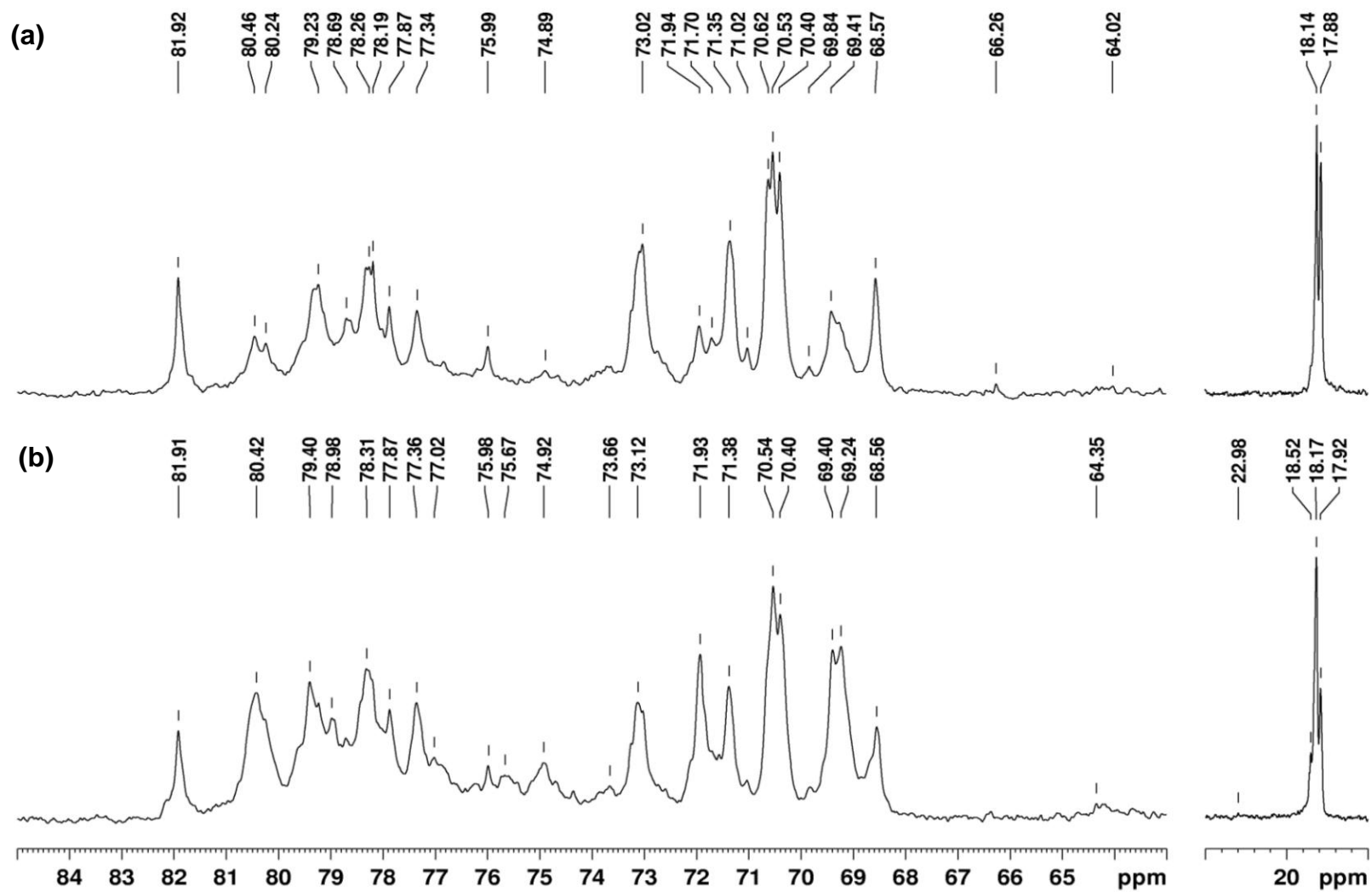


FIGURA 18 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DA REGIÃO DO ANEL DAS FRAÇÕES OX-6Sb (a) E OX-6Sc (b)

NOTA: Solvente: D_2O (70°C, pH 7); acetona como padrão interno 31,45 ppm.

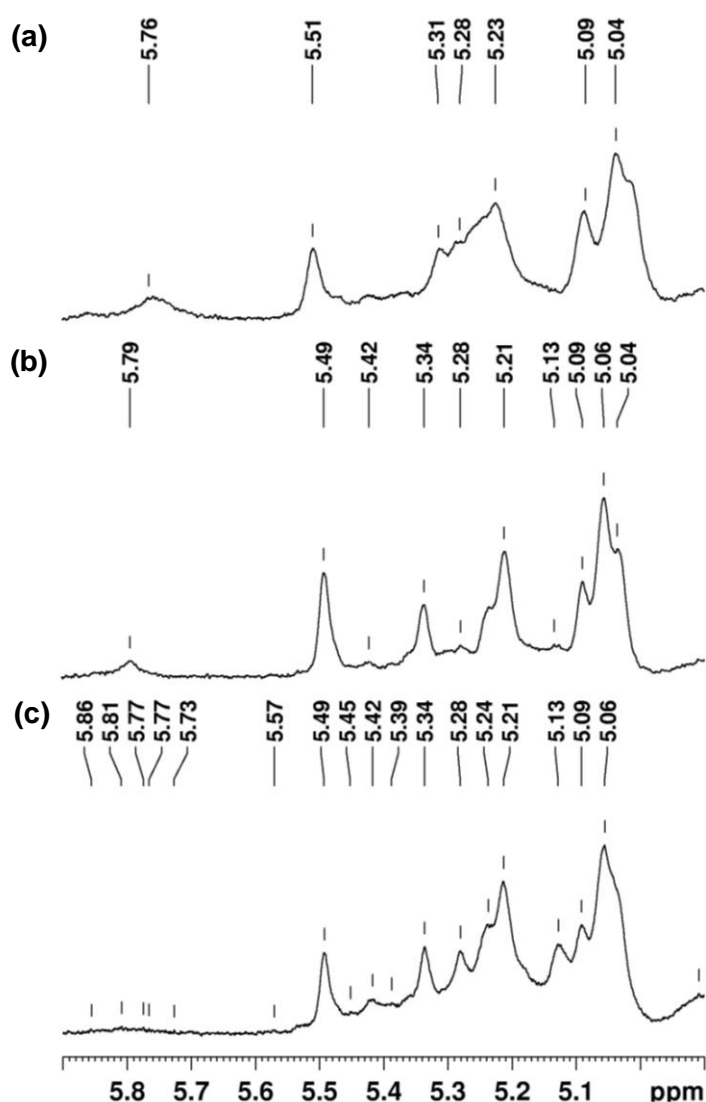


FIGURA 19 – ESPECTROS DE RMN DE ^1H DA REGIÃO ANOMÉRICA DAS FRAÇÕES OX-6S (a), OX-6Sb (b) E OX-6Sc (c)

NOTA: Solvente: D_2O (70°C, pH 7); acetona como padrão interno 2,225 ppm

Com base nos resultados encontrados para as subfrações obtidas por fracionamento em DEAE-Sephacel, foi possível verificar que a purificação por cromatografia de troca iônica foi eficiente na obtenção de uma fração polissacarídica homogênea quanto à massa molecular. No entanto, com o objetivo de purificar a fração de maior rendimento OX-6Sc, a mesma foi submetida a um novo fracionamento em cromatografia de troca iônica.

5.8 REFRACIONAMENTO DA FRAÇÃO OX-6Sc EM CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Para a tentativa de purificação da fração de maior rendimento eluída com NaCl 1,5M (OX-6Sc), 50 mg da fração foi submetida à coluna de DEAE-Sephacel, utilizando como eluentes água destilada e concentrações crescentes de NaCl, porém em intervalos menores que os utilizados na primeira coluna. As eluições foram monitoradas pelo teste colorimétrico do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), sendo as frações denominadas conforme Figura 20.

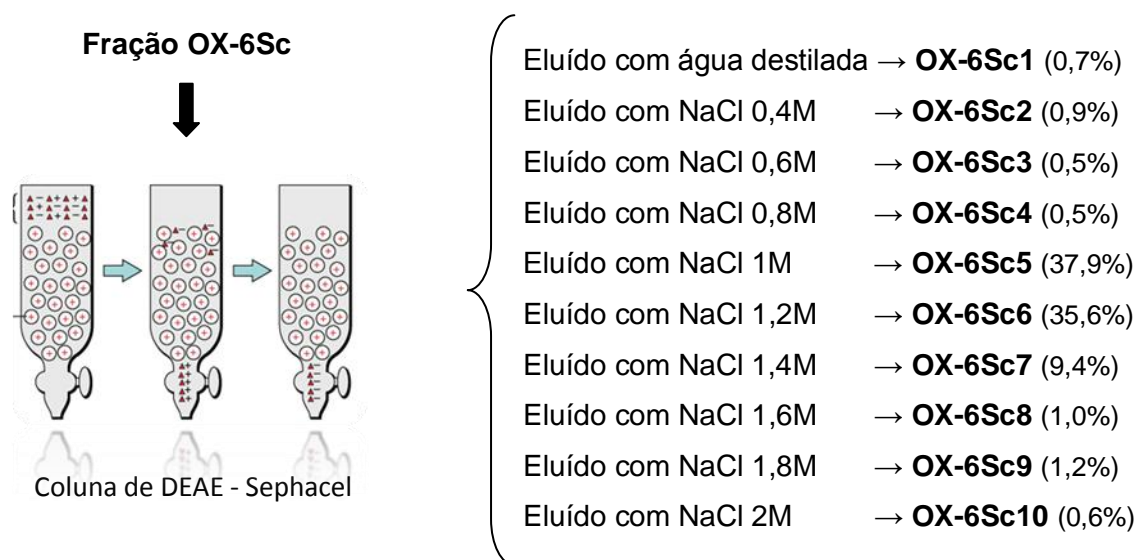


FIGURA 20 – ESQUEMA DE REFRACIONAMENTO DA FRAÇÃO OX-6Sc EM CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

NOTA: Rendimentos apresentados entre parênteses. Rendimentos em relação ao material submetido à coluna (50mg).

5.8.1 Rendimento, análises químicas e composição monossacarídica

O rendimento total do material recuperado na coluna foi de 88,3% em relação ao material aplicado. As frações de maior rendimento foram eluídas com NaCl 1M (OX-6Sc5) e NaCl 1,2M (OX-6Sc6), com 37,9 e 35,6% do material recuperado, respectivamente. Com exceção da fração eluída com NaCl 1,4M (OX-6Sc7), todas as outras frações apresentaram rendimentos inferiores a 2,0%. Sendo assim, as análises seguintes foram realizadas somente com as frações OX-6Sc5, OX-6Sc6 e OX-6Sc7.

Os teores de sulfato e ácidos urônicos presentes nas três frações foram similares, variando de 32,5 a 39,2% e 7,3 a 7,4%, respectivamente (TABELA 6). Em relação à composição monossacarídica foram encontradas percentagens de ramnose (87,3 – 90,2 mol%), xilose (3,8 – 6,1 mol%) e glucose (4,3 – 7,1 mol%).

TABELA 6 – ANÁLISES QUÍMICAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DE MAIOR RENDIMENTO

Subfração	Rendimento ^a (%)	Sulfato ^b (%)	Ácido urônico ^c (%)	Monossacarídeos ^d (mol%)		
				Rha ^e	Xyl	Glc
OX-6Sc5	37,9	39,2	7,4	87,4	5,5	7,1
OX-6Sc6	35,6	32,5	7,3	87,3	6,1	6,6
OX-6Sc7	9,4	34,2	7,3	90,2	3,8	4,3

^arendimento em relação à fração submetida à cromatografia de troca iônica (50mg); ^bdeterminado pelo método de Dodgson e Price (1962); ^cdeterminado segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991); ^dmonossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis; ^eabreviatura dos monossacarídeos: Rha= ramnose, Xyl= xilose, Glc= glucose.

5.8.2 Análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS-IR e RMN de ¹³C

As frações OX-6Sc5, OX-6Sc6 e OX-6Sc7 foram submetidas à análise de HPSEC-MALLS-IR e demonstraram um perfil similar entre si e semelhante ao da fração de origem OX-6Sc. Este resultado pode indicar a heterogeneidade das frações ou a presença de agregados (FIGURA 21).

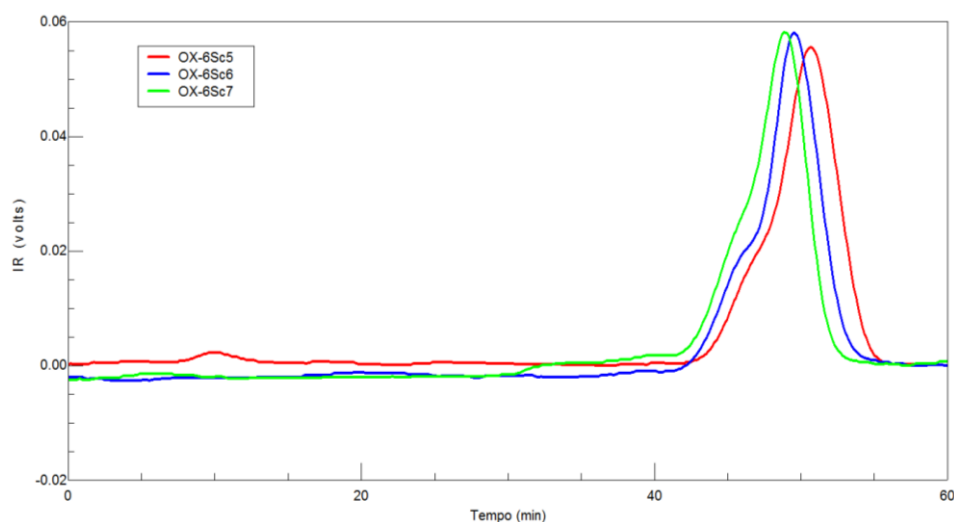


FIGURA 21 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DAS FRAÇÕES OX-6Sc5, OX-6Sc6 E OX-6Sc7

Comparando os espectros de RMN ^{13}C das frações de maior rendimento OX-6Sc5 e OX-6Sc6, nota-se a similaridade das frações (FIGURA 22). Os espectros apresentam os mesmos sinais com intensidades similares, indicando a presença do mesmo tipo de polímero.

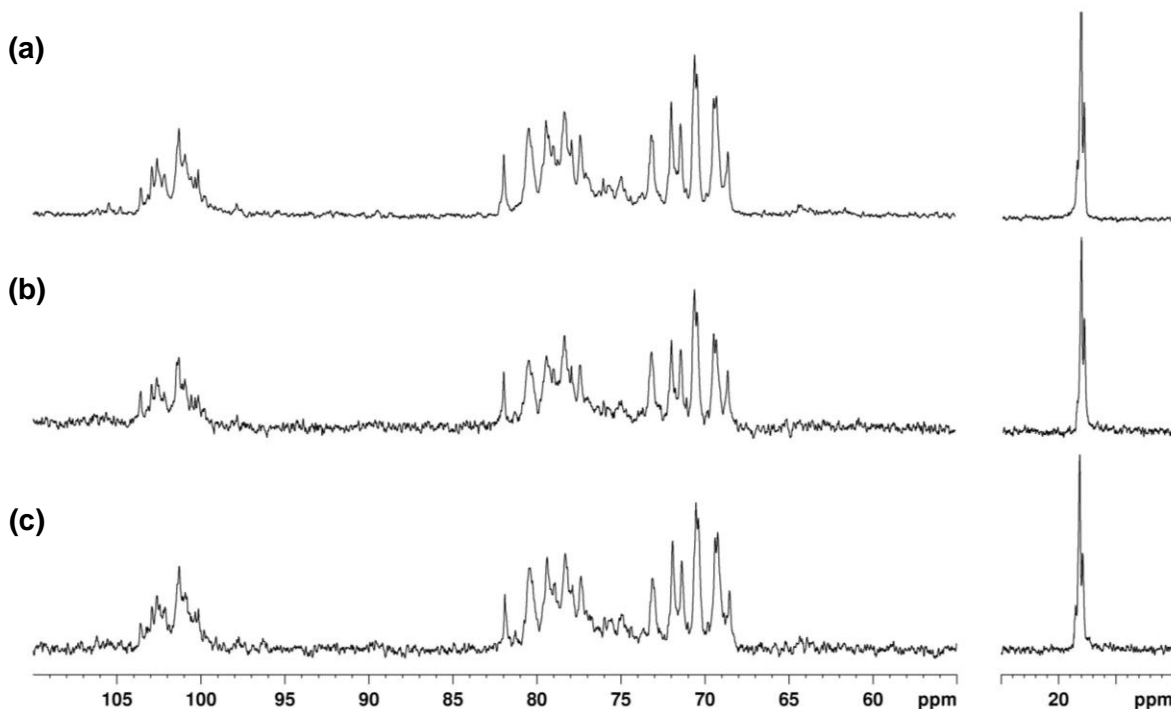


FIGURA 22 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO OX-6Sc (a) COMPARADA COM AS FRAÇÕES OX-6Sc5 (b) E OX-6Sc6 (c)

NOTA: Solvente: D_2O (70°C, pH 7); acetona como padrão interno 31,45 ppm.

O refracionamento em cromatografia de troca iônica da fração OX-6Sc resultou em subfrações com composição monossacarídica, espectros de RMN de ^{13}C e perfil cromatográfico em HPSEC-MALLS-IR similares. Verificando que após refracionamento em cromatografia de troca iônica as subfrações de OX-6Sc não apresentaram perfil simétrico em HPSEC-MALLS-IR, considera-se a possibilidade de formação de agregados devido a interações entre a cadeia polissacarídica presente na molécula.

Sendo assim, a fração OX-6Sc foi escolhida juntamente com a fração OX-6Sb para os estudos estruturais e de atividade biológica. A massa molecular calculada para a fração OX-6Sc foi de 251,1 kDa ($dn/dc = 0,137$), e foi aproximadamente 2 vezes maior que a massa da fração OX-6Sb (109,3 kDa).

5.9 CARBOXI-REDUÇÃO E DESSULFATAÇÃO DAS FRAÇÕES OX-6Sb E OX-6Sc

5.9.1 Carboxi-redução das frações OX-6Sb e OX-6Sc

Com a finalidade de identificar o tipo de ácido urônico presente, as frações OX-6Sb e OX-6Sc foram carboxi-reduzidas na presença de NaBD_4 , utilizando o método de Taylor e Conrad (1972). Nesta reação o ácido urônico presente no polissacarídeo nativo é convertido ao seu respectivo açúcar neutro (FIGURA 23). Usando NaBD_4 é possível diferenciar os monossacarídeos originados dos ácidos urônicos carboxi-reduzidos dos monossacarídeos neutros pré-existentes no polímero nativo. Os monossacarídeos originados a partir dos ácidos urônicos apresentam 2 unidades de massa a mais em C-6 quando comparados aos monossacarídeos neutros já existentes no polissacarídeo. Isto pode ser verificado pelos perfis de fragmentação dos monossacarídeos nas análises de CLG-EM, onde são avaliadas as presenças dos íons 217 (referente a hexoses) e 219 (referente a hexoses provenientes de ácidos urônicos).

O método de carboxi-redução, além de promover a identificação dos ácidos urônicos presentes na molécula, facilita a análise estrutural do polímero, visto que esses monossacarídeos ácidos impedem a hidrólise correta das ligações glicosídicas das unidades monossacarídicas vizinhas (BeMILLER, 1967).

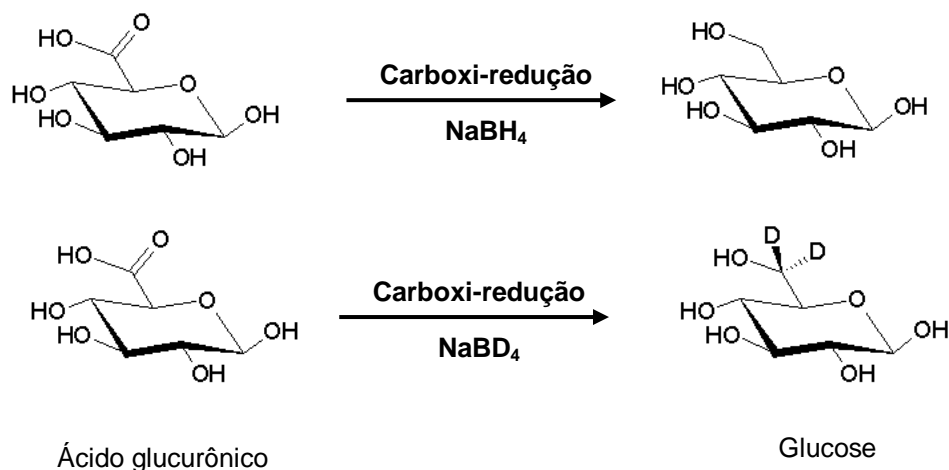


FIGURA 23 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROCESSO DE CARBOXI-REDUÇÃO DO ÁCIDO GLUCURÔNICO COM NaBH_4 e NaBD_4

Após o processo de carboxi-redução das frações OX-6Sb e OX-6Sc foi realizada a dosagem de ácidos urônicos pelo método colorimétrico descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), onde foi possível observar a conversão de 100% dos ácidos urônicos a monossacarídeos neutros. O material recuperado, em relação ao material inicial submetido à carboxi-redução, para a fração OX-6Sb-R foi 81,7% e 86,8% para a fração OX-6Sc-R (TABELA 7).

Os resultados obtidos através da composição monossacarídica das frações carboxi-reduzidas OX-6Sb-R e OX-6Sc-R, demonstraram um aumento significativo no conteúdo de glucose quando comparados com sua fração nativa. A fração OX-6Sb demonstrou um aumento de 2,9 \rightarrow 8,4 mol% de glucose após carboxi-redução, e a fração OX-6Sc aumento de 3,0 \rightarrow 9,4 mol% deste mesmo monossacarídeo após carboxi-redução. Esses resultados evidenciam a presença de ácido glucurônico nas frações nativas. Através do uso de NaBD_4 foi possível verificar por análises de CLG-EM, nos derivados glucitol hexaacetato, a presença dos íons com m/z 217 e 219. Esses fragmentos são referentes a hexoses neutras e hexoses

provenientes de ácidos urônicos, respectivamente. A porcentagem relativa desses íons, tanto na fração OX-6Sb-R quanto na fração OX-6Sc-R, indicou que ~66,0% do derivado glucitol hexaacetato foi originado a partir da carboxi-redução do ácido glucurônico.

Sendo assim, a fração OX-6Sb possui 5,5 mol% de ácido glucurônico e a fração OX-6Sc 6,2 mol%. Ressalta-se ainda que as quantidades de glucose presentes nas frações carboxi-reduzidas foram similares às encontradas nos respectivos produtos de degradação parcial de Smith nativos (OX-6Sb-R= 2,9 mol% e OX-6Sc-R= 3,2 mol%).

TABELA 7 – ANÁLISES QUÍMICAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OX-6Sb E OX-6Sc CARBOXI-REDUZIDAS E CARBOXI-REDUZIDAS E DESSULFATADAS

Subfração	Rendimento (%)	Ácido urônico ^d (%)	Sulfato ^e (%)	Monossacarídeos ^f (mol%)			
				Rha ^g	Xyl	Glc	GlcA ^h
OX-6Sb ^a		5,2	33,7	93,3	3,8	2,9	n.d.
OX-6Sb-R	81,7 ^b	--	n.d.	89,6	2,0	2,9	5,5
OX-6Sb-RD	57,7 ^c	n.d.	2,7	88,4	2,0	4,2	5,4
OX-6Sc ^a		6,9	41,1	95,0	2,0	3,0	n.d.
OX-6Sc-R	86,8 ^b	--	n.d.	87,8	2,8	3,2	6,2
OX-6Sc-RD	62,4 ^c	n.d.	2,7	87,8	2,7	3,3	6,2

--= não detectado; n.d.= não determinado; ^afração incluída para fins comparativos; ^brendimento em relação ao material submetido à carboxi-redução (OX-6Sb=100mg, OX-6Sc=140mg); ^crendimento em relação ao material submetido à dessulfatação (OX-6Sb= 45mg, OX-6Sc= 50mg); ^ddeterminado segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991); ^edeterminado pelo método de Dodgson e Price (1962); ^fmonossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis; ^gabreviatura dos monossacarídeos: Rha= ramnose, Xil= xilose, Glc= glucose, GlcA= ácido glucurônico; ^hquantificado como 1,6,6-trideutério glucitol hexaacetato.

5.9.2 Dessulfatação solvolítica das frações OX-6Sb e OX-6Sc

Para a determinação do posicionamento dos grupamentos sulfato, através de análises de RMN e metilação, foi realizada a dessulfatação solvolítica das frações carboxi-reduzidas OX-6Sb-R e OX-6Sc-R.

A dessulfatação foi realizada com os polissacarídeos na forma de sal de piridínio através da metodologia descrita por Nagasawa, Inoue e Tokuyasu (1979), originando as frações OX-6Sb-RD e OX-6Sc-RD, com 57,7 e 62,4% de rendimento, respectivamente (TABELA 7). Após esse processo as frações apresentaram 2,7% de grupos sulfato, correspondendo a 92,0 e 93,4% de dessulfatação para as frações OX-6Sb-RD e OX-6Sc-RD, respectivamente.

A análise comparativa da composição monossacarídica dos produtos dessulfatados (OX-6Sb-RD e OX-6Sc-RD) foi semelhante às respectivas frações carboxi-reduzidas (OX-6Sb-R e OX-6Sc-R), indicando que não houve degradação das frações no processo de dessulfatação (TABELA 7).

5.9.3 Análise de RMN de ^{13}C das frações carboxi-reduzidas (OX-6Sb-R e OX-6Sc-R) e carboxi-reduzidas e dessulfatadas (OX-6Sb-RD e OX-6Sc-RD)

Os espectros de RMN de ^{13}C das frações carboxi-reduzidas (OX-6Sb-R e OX-6Sc-R) apresentaram-se semelhantes aos respectivos espectros de suas frações de origem, diferindo apenas pelo aparecimento do sinal em 61,5 ppm que corresponde ao C-6 livre de unidades de hexose originadas após carboxi-redução dos ácidos urônicos (FIGURAS 24b e 25b). No entanto, como verificado por Cassolato *et al.* (2008), a carbodiimida (CMC) utilizada no processo de carboxi-redução apresenta sinais em 61,5 – 61,6 ppm, os quais estão sobrepostos nesses espectros aos correspondentes C-6 livres das hexoses, superestimando assim esses resultados.

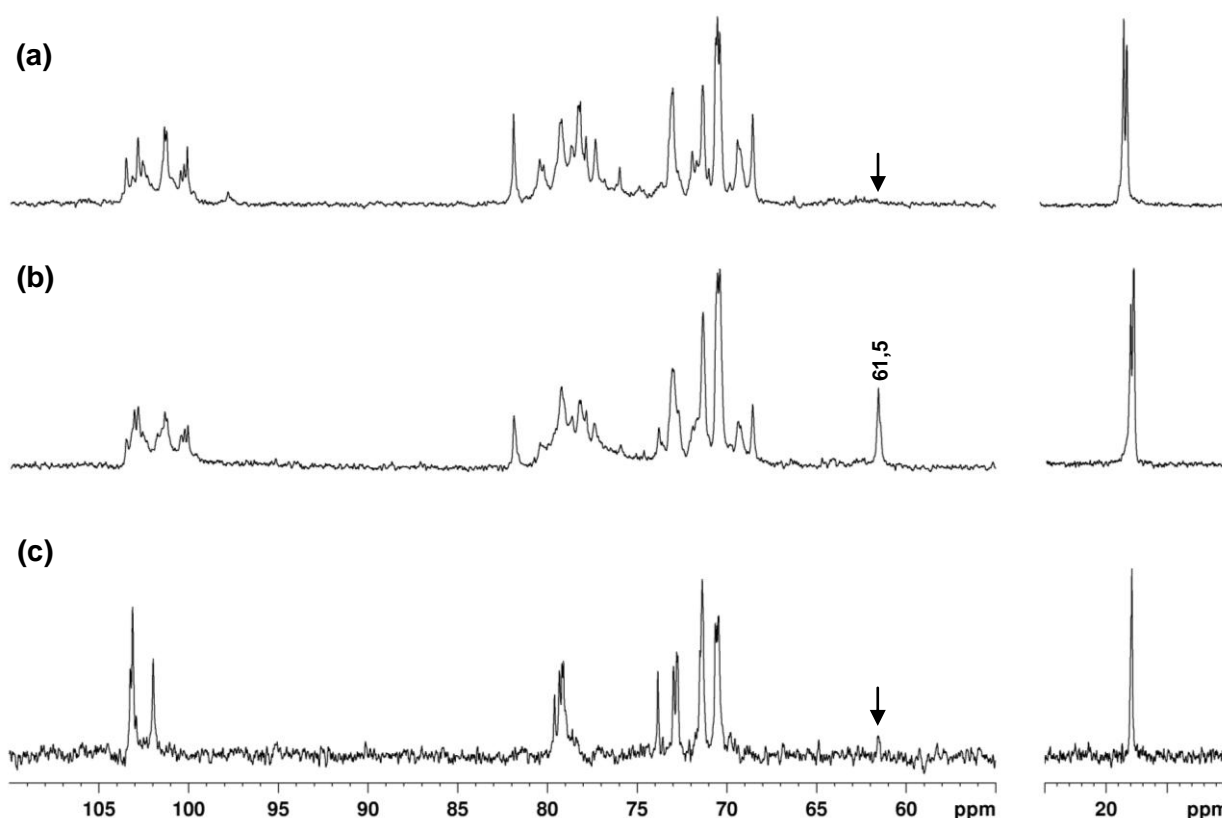


FIGURA 24 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO NATIVA OX-6Sb (a), FRAÇÃO CARBOXI-REDUZIDA OX-6Sb-R (b) E CARBOXI-REDUZIDA E DESSULFATADA OX-6Sb-RD (c)

NOTA: Solvente: D_2O (70°C, pH 7); acetona como padrão interno 31,45 ppm.

Após dessulfatação solvolítica conduzidas nas frações carboxi-reduzidas os espectros de RMN de ^{13}C se apresentaram mais simplificados, com a diminuição do número de sinais, sendo os mesmos mais definidos (FIGURAS 24c e 25c). Nota-se ainda, a diminuição de intensidade do sinal em 61,5 ppm, indicando que no processo de solvólise houve a eliminação da cabodiimida contaminante.

Após dessulfatação das duas frações, verifica-se ainda a presença de apenas dois sinais principais na região anomérica que são atribuídos a unidades de ramnose 2,3- e 2-ligadas (102,0 ppm) e 3-ligada (103,1 ppm) (FIGURA 26) (CASSOLATO *et al.*, 2008).

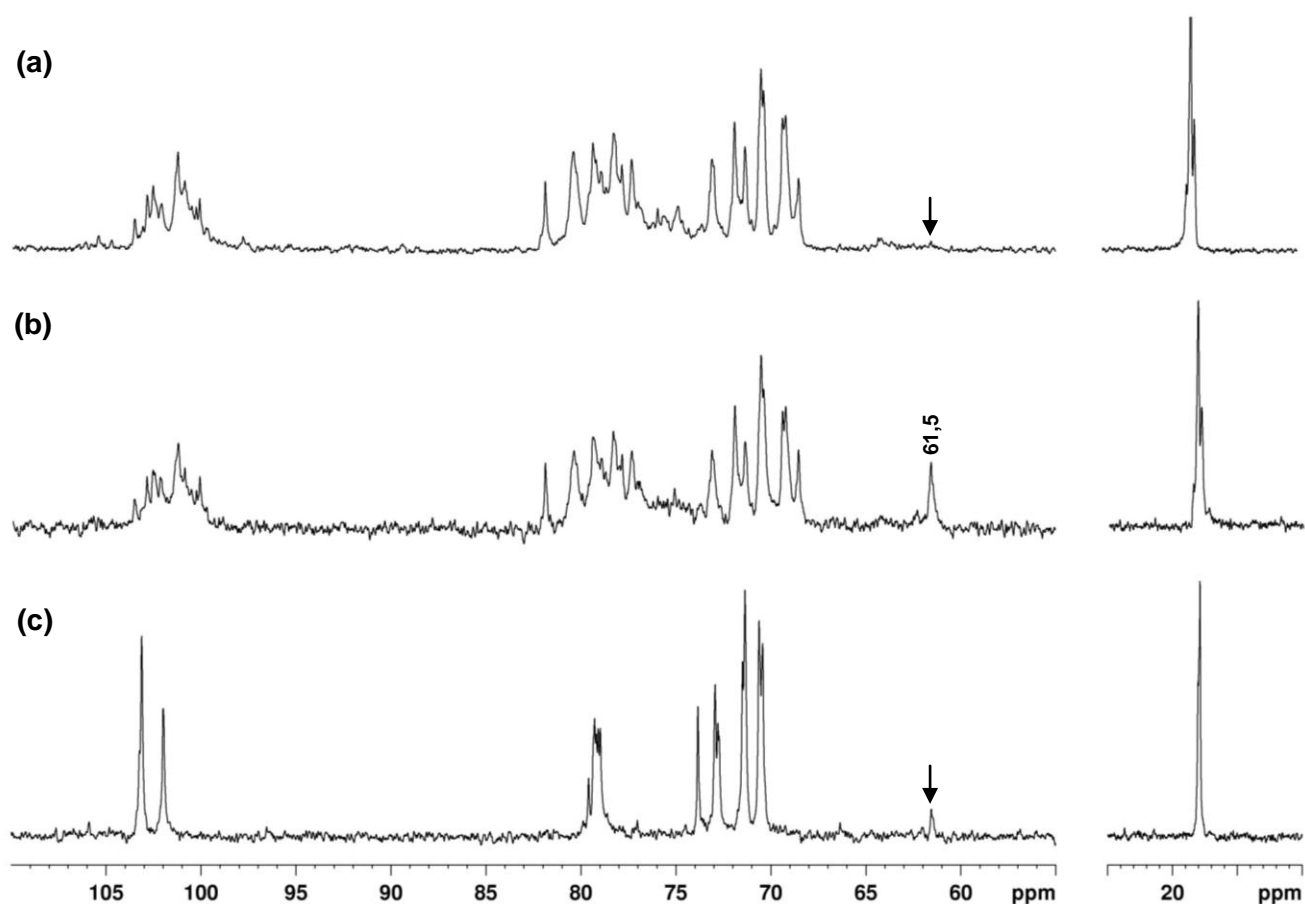


FIGURA 25 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO NATIVA OX-6Sc (a), FRAÇÃO CARBOXI-REDUZIDA OX-6Sc-R (b) E CARBOXI-REDUZIDA E DESSULFATADA OX-6Sc-RD (c)

NOTA: Solvente: D_2O (70°C, pH 7); acetona como padrão interno 31,45 ppm.

Com a finalidade de determinar os tipos de ligações glicosídicas presentes, o posicionamento dos grupos sulfato e o padrão de ramificação dos polímeros, as frações carboxi-reduzidas (OX-6Sb-R, OX-6Sc-R) e carboxi-reduzidas e dessulfatadas (OX-6Sb-RD, OX-6Sc-RD) foram submetidas ao processo de metilação descrito a seguir.

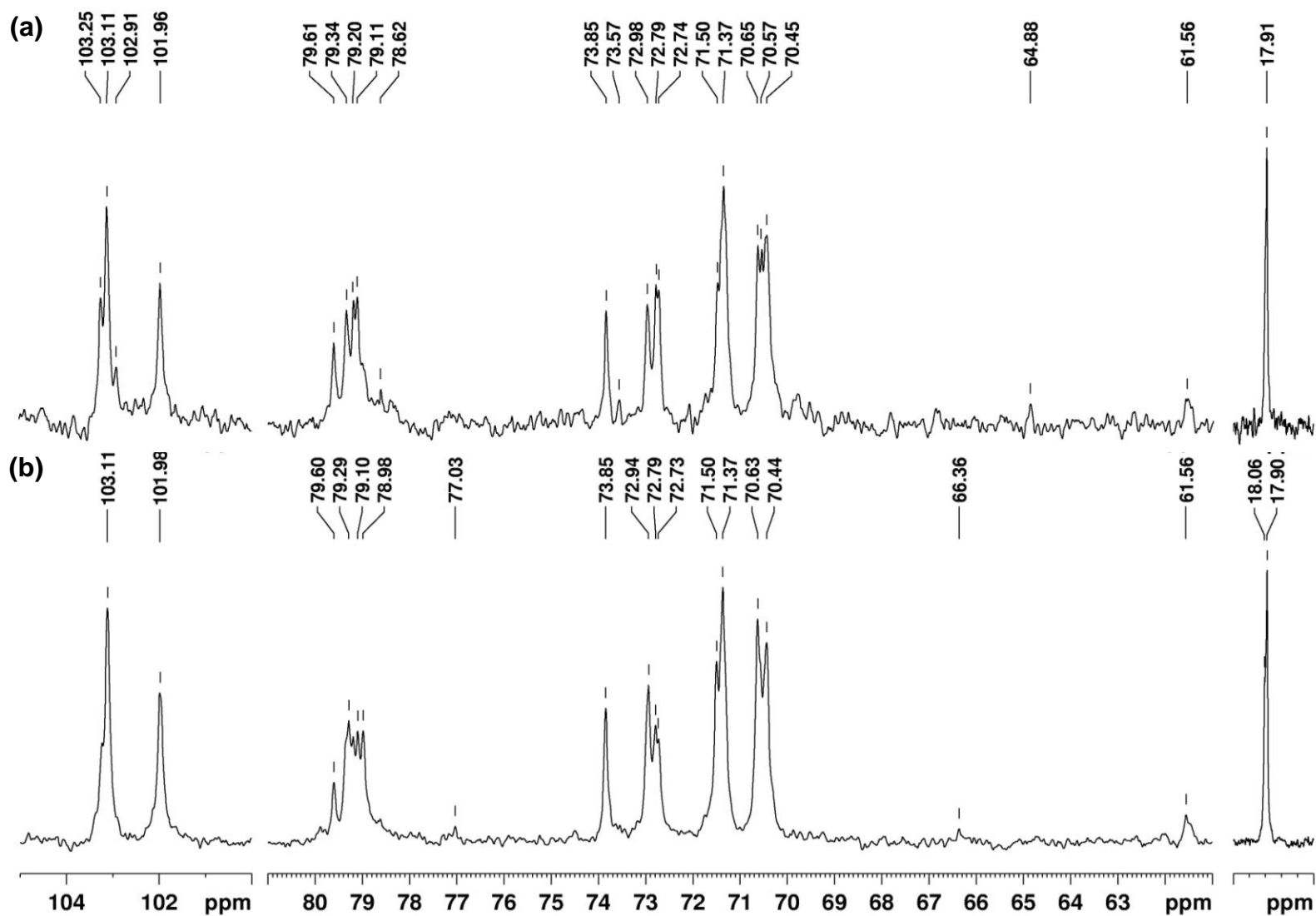


FIGURA 26 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES CARBOXI-REDUZIDAS E DESSULFATADAS OX-6Sb-RD (a) E OX-6Sc-RD (b)

NOTA: Solvente: D_2O (70°C, pH 7); acetona como padrão interno 31,45 ppm.

5.10 ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES CARBOXI-REDUZIDAS (OX-6Sb-R, OX-6Sc-R) E CARBOXI-REDUZIDAS E DESSULFATADAS (OX-6Sb-RD, OX-6Sc-RD)

A análise de metilação das frações carboxi-reduzidas (OX-6Sb-R e OX-6Sc-R) e carboxi-reduzidas e dessulfatadas (OX-6Sb-RD e OX-6Sc-RD) foi realizada de acordo com a metodologia de Ciucanu e Kerek (1984). Os polissacarídeos foram inicialmente dialisados contra solução de trietilamina (5% m/v) para se tornarem solúveis em DMSO (solvente aprótico da reação). Os derivados metilados, obtidos após hidrólise, foram analisados por CLG-EM na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados.

Analisando os resultados de metilação das frações carboxi-reduzidas (TABELA 8) observa-se a presença de derivados de ramnose trimetilados (2,3,4-Me₃-Rha), derivados dimetilados (2,4-Me₂-Rha, 3,4-Me₂-Rha e 2,3-Me₂-Rha) e monometilados (2-Me-Rha, 3-Me-Rha e 4-Me-Rha) além de ramnose não metilada (Rha) nas duas frações. A alta percentagem de ramnose não metilada mesmo após três etapas de metilação demonstra que esse derivado não é produto da submetilação das amostras, indicando assim a presença de unidades de Rha 2,3,4-substituídas nas frações. Para melhor entendimento as duas frações serão analisadas separadamente.

TABELA 8 – ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES OX-6Sb E OX-6Sc CARBOXI-REDUZIDAS E CARBOXI-REDUZIDAS E DESSULFATADAS

Derivado	Ligação	TR ^a	Frações			
			OX-6Sb-R	OX-6Sb-RD	OX-6Sc-R	OX-6Sc-RD
2,3,4-Me ₃ -Rha ^c	Rhap-(1→	7:19	3,0 ^b	5,0	3,0	5,0
2,4-Me ₂ -Rha	→3)-Rhap-(1→	9:01	15,3	48,4	8,4	43,5
3,4-Me ₂ -Rha	→2)-Rhap-(1→	8:75	4,7	23,4	2,1	24,4
2,3-Me ₂ -Rha	→4)-Rhap-(1→	8:92	3,0	--	2,0	--
2-Me-Rha	→3,4)-Rhap-(1→	10:53	12,1	--	18,4	--
3-Me-Rha	→2,4)-Rhap-(1→	11:37	16,7	3,0	16,1	4,9
4-Me-Rha	→2,3)-Rhap-(1→	10:93	23,0	11,8	20,0	13,5
Rha	→2,3,4)-Rhap-(1→	12:02	14,4	2,4	22,3	--
2,3,4,6-Me ₄ -Glc ^d	Glc pA-(1→	9:18	--	1,0	--	1,5
2,3,6-Me ₃ -Glc ^e	→4)-Glc pA-(1→	13:01	3,0	5,0	4,6	7,6
3,6-Me ₂ -Glc ^f	→2,4)-Glc pA-(1→	16:80	2,8	--	3,1	--
2,3,6-Me ₃ -Glc	→4)-Glc p-(1→	13:01	tr.	1,0	--	--

--= não detectado; tr.= traço; ^atempo de retenção (em min) dos derivados analisados em coluna DB-225; ^bmol% dos monossacarídeos quantificados na forma de alditóis acetato parcialmente metilados; ^c2,3,4-Rha analisada como 1,5-di-O-acetil-2,3,4-O-metilrhamnitol, e assim por diante; ^dderivados carboxi-reduzidos analisados como: 1,5-di-O-acetil-(1,6,6-trideutério)-2,3,4,6-tetra-O-metil glucitol; ^e1,4,5-tri-O-acetil-(1,6,6-trideutério)-2,3,6-tri-O-metil glucitol; ^f1,2,4,5-tetra-O-acetil-(1,6,6-trideutério)-3,6-di-O-metil glucitol.

5.10.1 Análise de metilação da fração OX-6Sb carboxi-reduzida (OX-6Sb-R) e carboxi-reduzida e dessulfatada (OX-6Sb-RD)

Os principais produtos de metilação da fração OX-6Sb-R foram os derivados parcialmente metilados 4-Me-Rha, 3-Me-Rha, 2,4-Me₂-Rha, ramnose não metilada (Rha) e 2-Me-Rha como apresentado na Tabela 8. Dentre os produtos de metilação da fração OX-6Sb-R os derivados metilados 2,4-Me₂-Rha (15,3 mol%) e 3,4-Me₂-Rha (4,7 mol%) são correspondentes a unidades de ramnose 3- e 2-ligadas. Após dessulfatação solvolítica verifica-se o aumento desses derivados (15,3 → 48,4 mol% e 4,7 → 23,4 mol%), respectivamente, juntamente com o desaparecimento e decréscimo significativo dos derivados 2-Me-Rha e 3-Me-Rha, respectivamente. Esses resultados confirmam que a fração OX-6Sb contém unidades de ramnose 3- e 2-ligadas sulfatadas em C-4. Além disso, na análise dos produtos de metilação da fração dessulfatada observa-se um decréscimo do teor de ramnose não metilada (Rha) quando comparada com a presente nos produtos de metilação da fração nativa (14,4 → 2,4 mol%). Da mesma forma, o derivado 4-Me-Rha apresentou decréscimo após dessulfatação (23,0 → 11,8 mol%). A presença de 4-Me-Rha entre os produtos de metilação da fração dessulfatada (11,8 mol%) pode ser correspondente a pontos de ramificação, ou seja, unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas. Por analogia com os resultados obtidos por Cassolato *et al.* (2008), estes pontos de ramificação estão ~50% não substituídos em C-4 e 50% sulfatados em C-4. Neste último caso, 6,2 mol% dos 14,4 mol% do derivado Rha presente na fração OX-6Sb-R corresponde aos pontos de ramificação 4-sulfatados. Ainda em relação à presença do derivado 4-Me-Rha (23,0 mol%) entre os produtos de metilação da fração OX-6Sb-R, 17,4 mol% são correspondentes a unidade de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-2. O derivado Rha presente nos produtos de metilação de OX-6Sb-R (14,4 mol%) além de corresponder a pontos de ramificação sulfatados (6,2 mol%), foi atribuído a unidades de ramnose 3-ligadas 2,4-sulfatadas (3,5 mol%) e a unidades de ramnose 2-ligadas 3,4-sulfatadas (4,7 mol%). Esses resultados estão de acordo com a determinação da estrutura química dos polissacarídeos de *G. oxysperma* realizados por Cassolato *et al.* (2008).

Na fração carboxi-reduzida OX-6Sb-R os derivados metilados 2,3,4-Me₃-Rha (3,0 mol%) e 2,3-Me₂-Rha (3,0 mol%) foram atribuídos a unidades de ramnose como terminais não redutores não sulfatadas e sulfatadas em C-4, respectivamente. Estes resultados são confirmados pelo desaparecimento do derivado 2,3-Me₂-Rha entre os produtos de metilação da fração dessulfatada e um aumento equivalente (5,0 mol%) do derivado 2,3,4-Me₃-Rha.

Em relação aos derivados metilados de glucose (decorrente da redução do ácido glucurônico) a fração carboxi-reduzida apresentou baixas percentagens dos derivados 2,3,6-Me₃-Glc e 3,6-Me₂-Glc, correspondentes a unidades de glucose 4-ligadas e 2,4-substituídas, respectivamente. Após dessulfatação o aumento de 2,3,6-Me₃-Glc (3,0 → 5,0 mol%), com concomitante desaparecimento de 3,6-Me₂-Glc indica a presença de ácido glucurônico 4-ligado sulfatado em C-2 (2,8 mol%) e não substituído neste carbono (3,0 mol%). Observa-se ainda, a presença de 1,0 mol% do derivado 2,3,6-Me₃-Glc na fração dessulfatada correspondente a unidades de glucose 4-ligadas. Essa diferenciação entre os derivados provenientes da glucose e ácido glucurônico foi possível devido a carboxi-redução da fração OX-6Sb com NaBD₄, com subsequente hidrólise, redução com NaBD₄ e acetilação. Sendo assim, os derivados parcialmente metilados provenientes dos ácidos glucurônicos apresentaram-se com 2 unidades a mais de massa quando comparados com os derivados da glucose, podendo ser identificados pelo perfil de fragmentação em GLC-EM, onde são avaliadas as presenças dos íons 235 para os derivados provenientes de ácidos glucurônios e 233 para os derivados de glucose.

Nota-se ainda, na fração dessulfatada, o aparecimento do derivado 2,3,4,6-Me₄-Glc (1,0 mol%) correspondente a unidade de ácido glucurônico como terminal não redutor (TNR). Ressalta-se que o teor de TNR para a fração OX-6Sb (6,0 mol%) é menor que o esperado, considerando que o polímero contém 11,8 mol% de pontos de ramificação. Este fato pode ser atribuído a perda de derivados tri- e tetra-metilados durante a derivatização da amostra, devido à sua maior volatilidade (BIERMANN; MCGINNIS, 1990).

5.10.2 Análise de metilação da fração OX-6Sc carboxi-reduzida (OX-6Sc-R) e carboxi-reduzida e dessulfatada (OX-6Sc-RD)

Assim como para a fração OX-6Sb-R, os mesmos 10 tipos de derivados parcialmente metilados estão presentes entre os produtos de metilação da fração OX-6Sc-R. Ramnose não metilada (Rha), 4-, 2- e 3-Me-Rha são os principais derivados, sendo que os dois primeiros apresentam-se em percentagens mais elevadas. A fração OX-6Sc após dessulfatação solvolítica apresentou aumento dos derivados dimetilados 2,4-Me₂-Rha (8,4 → 43,5 mol%) e 3,4-Me₂-Rha (2,1 → 24,4 mol%) correspondente a unidade de ramnose 3- e 2-ligadas, com concomitante desaparecimento e decréscimo dos derivados 2-Me-Rha (18,4 mol% → 0) e 3-Me-Rha (16,1 → 4,9 mol%), respectivamente. Estes resultados demonstram a presença de unidades de ramnose 3- e 2-ligadas 4-sulfatadas. Adicionalmente, após dessulfatação foi observado o desaparecimento da ramnose não metilada (Rha) e a redução significativa do derivado 4-Me-Rha (20,0 → 13,5 mol%). A presença de 13,5 mol% do derivado 4-Me-Rha pode corresponder, pelo menos em parte a unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas (2-ligada 3-ramificada e/ou 3-ligada 2-ramificada). Assim como na fração OX-6Sb e com base nos dados de Cassolato *et al.* (2008), esses pontos de ramificação estão ~50% sulfatados em C-4 (7,1 mol%) e ~50% não substituídos em C-4 (6,4 mol%). Em relação à presença do derivado 4-Me-Rha (20,0 mol%) dentre os produtos de metilação da fração OX-6Sc-R, 13,6 mol% são correspondentes a unidades de ramnose 3-ligadas 2-sulfatadas. O derivado Rha presente nos produtos de metilação de OX-6Sc-R (22,3 mol%) além de corresponder a pontos de ramificação sulfatados (7,1 mol%), foi atribuído a unidades de ramnose 2-ligadas 3,4-sulfatadas (11,1 mol%) e a unidades de ramnose 3-ligadas 2,4-sulfatadas (3,1 mol%).

Após dessulfatação da fração OX-6Sc nota-se ainda o aumento de unidades de ramnose como terminais não redutores (2,3,4-Me₃-Rha) de 3,0 → 5,0 mol%, com concomitante desaparecimento do derivado 2,3-Me₂-Rha. Deste modo, OX-6Sc-R contém 3,0 mol% de ramnose como TNR não sulfatadas e 2,0 mol% de TNR 4-sulfatadas. A presença de unidades de ramnose como TNR sulfatados em C-4 não foi observada por Cassolato *et al.* (2008).

Em relação aos derivados correspondentes ao ácido glucurônico carboxi-reduzido, observa-se após a dessulfatação, o aumento do derivado 2,3,6-Me₃-Glc (4,6 → 7,6 mol%) com desaparecimento de 3,6-Me₂-Glc, indicando a presença de ácido glucurônico 4-ligado 2-sulfatado (3,1 mol%) além de ácido glucurônico 4-ligado (4,6 mol%). Observa-se ainda somente na fração dessulfatada a presença do derivado 2,3,4,6-Me₄-Glc (1,5 mol%) correspondente a TNR de ácido glucurônico.

A percentagem dos derivados 2,3,4-Me₃-Rha e 2,3,4,6-Me₄-Glc, correspondentes a unidades de ramnose e ácido glucurônico carboxi-reduzido como TNR (total de 6,5 mol%), respectivamente, entre os produtos de metilação da fração OX-6Sc-RD é menor que a percentagem do derivado 4-Me-Rha (13,5 mol%), atribuído as unidades de ramnose ramificadas em C-2 ou em C-3. Como discutido anteriormente, devido a sua maior volatilidade, os derivados 2,3,4-Me₃-Rha e 2,3,4,6-Me₄-Glc podem ter sido perdidos durante a derivatização (acetatos de alditóis parcialmente metilados).

Destaca-se que, embora as frações OX-6Sb-R e OX-6Sc-R não tenham sido submetidas ao processo seqüencial de metilação, dessulfatação e trideuteriometilação, os resultados das análises de metilação foram interpretados com base nos obtidos por Cassolato *et al.* (2008), onde o processo seqüencial acima mencionado foi realizado. Ressalta-se ainda que os resultados de metilação para as frações OX-6Sb e OX-6Sc no presente trabalho foram confirmados pelas análises de RMN (FIGURAS 28 e 29, p. 94 e 95).

5.10.3 Análise comparativa dos resultados de metilação dos produtos de degradação controlada de Smith (OX-6Sb e OX-6Sc)

As unidades de ramnose e ácido glucurônico que compõem as frações OX-6Sb e OX-6Sc estão apresentadas na Tabela 9. As frações são constituídas por diferentes tipos de unidades de ramnose 3- e 2-ligadas na relação de 2:1 e 1,8:1, respectivamente. Em OX-6Sc as unidades de ramnose 3- e 2-ligadas estão 81% e 90% sulfatadas, enquanto que para OX-6Sb esses valores são menores, 68% e 80%, respectivamente. Os produtos de degradação controlada de Smith OX-6Sb e

OX-6Sc se diferenciam ainda, quanto ao grau de sulfatação em C-2 e em C-4 das unidades 3-ligadas, e C-4 e em C-3 e C-4 das unidades 2-ligadas. Na fração OX-6Sb unidades de ramnose 3-ligadas 2- e 4-sulfatadas representam 52,7% e 36,7% das unidades sulfatadas, enquanto este valor para a fração OX-6Sc é de 38,7% e 52,4%, respectivamente. Deste modo, a fração OX-6Sb é constituída por ~53% de unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-2 enquanto a fração OX-6Sc apresenta ~53% de unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-4.

TABELA 9 – UNIDADES PRESENTES NAS FRAÇÕES NATIVAS OX-6Sb E OX-6Sc DE ACORDO COM OS DADOS DE METILAÇÃO

Unidade ^a	Frações	
	OX-6Sb	OX-6Sc
Ramnose como TNR	3,0 ^b	3,0
Ramnose como TNR 4-sulfato	3,0	2,0
Unidades 3-ligadas		
Ramnose 3-ligada	15,3	8,4
Ramnose 3-ligada 2-sulfatada	17,4	13,6
Ramnose 3-ligada 4-sulfatada	12,1	18,4
Ramnose 3-ligada 2,4-sulfatada	3,5	3,1
Unidades 2-ligadas		
Ramnose 2-ligada	4,7	2,1
Ramnose 2-ligada 4-sulfatada	13,7	11,2
Ramnose 2-ligada 3,4-sulfatada	4,7	11,1
Pontos de ramificação		
Ramnose 2,3-dissubstituída	5,6	6,4
Ramnose 2,3-dissubstituída 4-sulfatada	6,2	7,1
Unidades de ácido glucurônico		
Ácido glucurônico 4-ligado	3,0	4,6
Ácido glucurônico 4-ligado 2-sulfatado	2,8	3,1
Ácido glucurônico como TNR ^c	1,0	1,5
Glucose 4-ligada	1,0	--

--= não detectado; ^ade acordo com os dados obtidos pela metilação das frações carboxi-reduzidas e carboxi-reduzidas e dessulfatadas e percentagens obtidas de *G. oxysperma* por Cassolato *et al.* (2008); ^bmol% dos monossacarídeos quantificados na forma de alditóis acetato parcialmente metilados; ^capenas entre os produtos de metilação das frações dessulfatadas.

Outro diferencial entre os dois produtos de degradação controlada de Smith relaciona-se com a percentagem do posicionamento dos grupos sulfato nas unidades de ramnose 2-ligadas. As frações apresentam unidades de ramnose 2-ligadas 4- e 3,4-sulfatadas na relação de 3:1 para a fração OX-6Sb e 1:1 para a fração OX-6Sc. Deste modo, a fração OX-6Sc é constituída por maior percentagem de unidades de ramnose 2-ligadas dissulfatadas. Assim, em termos estruturais, a fração OX-6Sc se diferencia principalmente da fração OX-6Sb por ser constituída por maiores percentagens de ramnose 2-ligada 3,4-sulfatadas (2,4:1), bem como unidade de ramnose 3-ligadas 4-sulfatadas (1,5:1), como pode ser verificado na Tabela 10.

Entre os produtos de metilação das frações carboxi-reduzidas (OX-6Sb-R e OX-6Sc-R) e carboxi-reduzidas e dessulfatadas (OX-6Sb-RD e OX-6Sc-RD) não foi detectada a presença de derivados de xilose. A composição monossacarídica das frações OX-6Sb e OX-6Sc apresenta 3,8 e 2,0 mol% desta pentose, respectivamente. Provavelmente a heterogeneidade das ligações glicosídicas envolvendo a xilose, levando a diferentes tipos de derivados metilados, pode ser responsável pela sua não detecção.

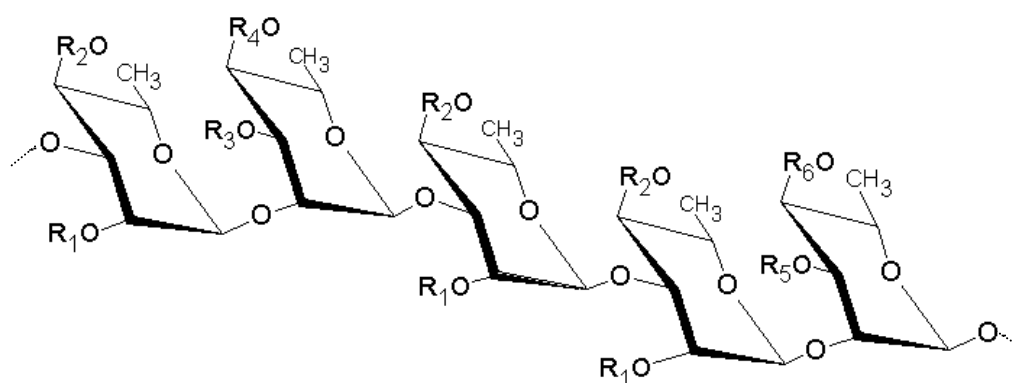
TABELA 10 – PROPORÇÃO DE UNIDADES DE RAMNOSE 3- E 2-LIGADAS PRESENTES NAS FRAÇÕES OX-6Sb E OX-6Sc

Frações	Unidades de ramnose 3-ligadas				Unidades de ramnose 2-ligadas		
	3L ^a	3L 2S	3L 4S	3L 2,4S	2L	2L 4S	2L 3,4S
OX-6Sb	0,9	1,0	0,7	0,2	0,3	1,0	0,3
OX-6Sc	0,4	0,7	1,0	0,2	0,2	1,0	1,0

^aabreviatura: L=ligada, S=sulfato.

Esses resultados indicam que o método de fracionamento utilizado através de cromatografia de troca iônica foi eficaz na purificação da fração degradada de Smith (OX-6S), gerando duas subfrações com composição monossacarídica similares, porém com diferenças estruturais importantes. Além das diferenças estruturais observadas pela análise de metilação, as frações apresentam teores de sulfato e massas moleculares diferenciadas. A fração OX-6Sc possui maior quantidade de grupamentos sulfato (41,1%) quando comparada com a fração

OX-6Sb (33,7%), sendo a primeira aproximadamente duas vezes maior em relação à massa molecular (251,1 kDa), quando comparada com a fração OX-6Sb (109,3 kDa). A Figura 27 ilustra as principais unidades de ramnose presentes nas frações OX-6Sb e OX-6Sc.



Substituinte	Fração (mol%)		
	OX-6Sb	OX-6Sc	Go3r ^a
R ₁ = R ₂ = H	15,3	8,4	6,2
R ₁ = R ₂ = SO ₃ ⁻	3,5	3,1	5,0
R ₁ = H; R ₂ = SO ₃ ⁻	12,1	18,4	10,3
R ₁ = SO ₃ ⁻ ; R ₂ = H	17,4	13,6	13,5
R ₃ = cadeias laterais	11,8	13,5	13,5
R ₄ = H	5,6	6,4	6,3
R ₄ = SO ₃ ⁻	6,2	7,1	7,2
R ₅ = R ₆ = H	4,7	2,1	3,6
R ₅ = R ₆ = SO ₃ ⁻	4,7	11,1	3,3
R ₅ = H; R ₆ = SO ₃ ⁻	13,7	11,2	8,1

FIGURA 27 – PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (OX-6Sb E OX-6Sc)

Nota: adaptado de Cassolato *et al.* (2008); ^aheteroramnana sulfatada (Mw=1519 kDa) obtida por Cassolato *et al.* (2008), adicionada para fins comparativos.

5.11 ANÁLISES DE RMN BIDIMENSIONAIS DAS FRAÇÕES OX-6Sb E OX-6Sc

As análises de RMN bidimensionais (HSQC) foram realizadas com as frações nativas (OX-6Sb e OX-6Sc) e carboxi-reduzidas e dessulfatadas (OX-6Sb-RD e OX-6Sc-RD). Os assinalamentos obtidos foram comparados com os descritos por Cassolato *et al.* (2008) para essa mesma espécie de alga.

A partir das análises de HSQC conduzidas com os produtos de degradação controlada de Smith OX-6Sb e OX-6Sc, foi possível verificar as correlações de seus átomos de C e H. Os sinais anoméricos em 100,5/5,34 ppm, 100,3-100,1/5,49 ppm e 97,8/5,79 ppm (OX-6Sb) e 100,5/5,33 ppm e 100,3-100,1/5,49 ppm (OX-6Sc) são correspondentes a unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-2 e em C-2 e C-4 (FIGURA 28a,c). Os sinais na região de 78,3-78,2 ppm (OX-6Sb) e 78,4 ppm (OX-6Sc) correlacionam-se com seu hidrogênio em 4,70 ppm e é correspondente ao C-2 sulfatado dessas unidades. A ausência do acoplamento deste sinal nos espectros das frações dessulfatadas OX-6Sb-RD e OX-6Sc-RD, confirma o assinalamento anterior (FIGURA 29b,d).

Os sinais anoméricos em 101,4-101,3/5,21 e 101,0/5,27 ppm e 101,3/5,21 e 100,9/5,28 ppm nas frações OX-6Sb e OX-6Sc, respectivamente, foram atribuídos a unidades de ramnose 2-ligada sulfatadas em C-4 e em C-3 e C-4. Esses sinais poderiam corresponder também a unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas sulfatadas ou não em C-4. Os sinais em 81,9 ppm e 80,5/4,36 ppm (OX-6Sb) e 80,4/4,34 ppm (OX-6Sc) foram atribuídos ao C-4 sulfatado das unidades de ramnose 2-ligadas 4- e 3,4-sulfatadas, respectivamente. Os sinais de C-5/H-5 encontram-se em 68,6/3,93-3,95 ppm (OX-6Sb) e 68,5/3,93-3,95 ppm (OX-6Sc) para as unidades 2-ligadas 4-sulfatadas e em 69,4/3,93-3,95 ppm (OX-6Sb) e em 69,2-69,4/3,95 ppm (OX-6Sc) para as unidades 2-ligadas 3,4-sulfatadas.

Os sinais anoméricos em 103,5-102,6 ppm e 103,6-102,6 ppm correlacionam-se com seus prótons geminais em 5,04-5,09 ppm nas frações OX-6Sb e OX-6Sc, respectivamente, sendo esses sinais atribuídos a unidades de ramnose 3-ligadas e 3-ligadas 4-sulfatadas. Os acoplamentos dos sinais do C-2 em 71,3 ppm (OX-6Sb) e 71,4 ppm (OX-6Sc) com H-2 em 4,17-4,15 ppm são referentes ao C-2

livre dessas unidades. As unidades de ramnose 3-ligadas 4-sulfatadas apresentaram deslocamentos para C-4/H-4 em 80,5/4,36 ppm (OX-6Sb) e 80,4/4,34 ppm (OX-6Sc) e para C-5/H-5 em 69,4/3,93-3,95 ppm (OX-6Sb) e 69,4-69,2/3,95 ppm (OX-6Sc). Verificando esses dados observam-se em ambas as frações (OX-6Sb e OX-6Sc) a presença de unidades de ramnose 3- e 2-ligadas, sulfatadas em diferentes posições, confirmando os dados da obtidos por metilação (TABELA 9, p. 90).

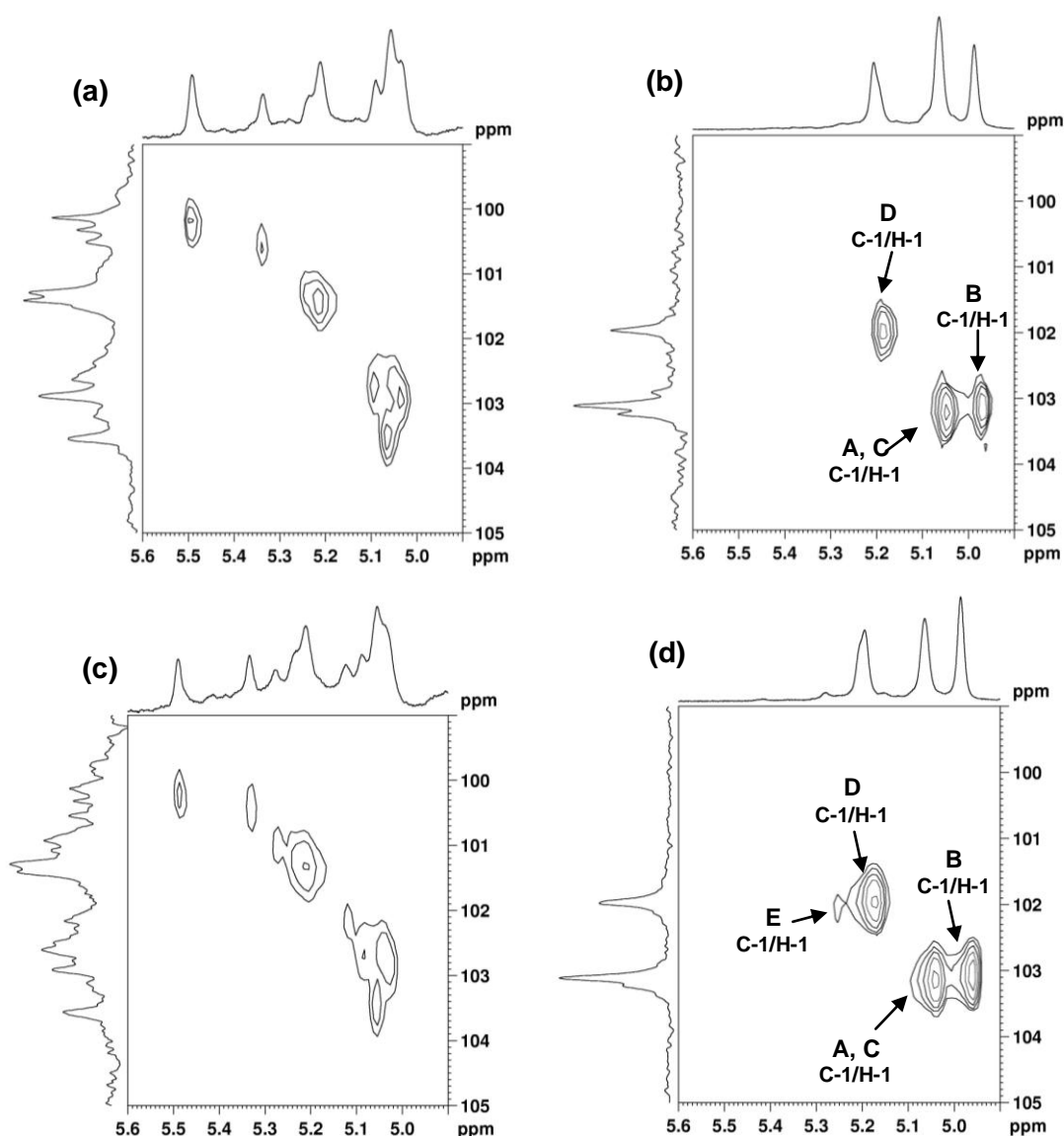


FIGURA 28 – ESPECTROS DE HSQC DA REGIÃO ANOMÉRICA DAS FRAÇÕES NATIVAS: OX-6Sb (a) E OX-6Sc (c) E DESSULFATADAS: OX-6Sb-RD (b) E OX-6Sc-RD (d)

NOTA: Solvente: D_2O (70°C, pH 7); acetona como padrão interno (^{13}C = 31,45 ppm, ^1H = 2,225 ppm); **A** = [\rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)], **B** = [\rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)], **C** = [\rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)], **D** = [\rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow)], **E** = [\rightarrow 2,3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow)] (ver Figura 30).

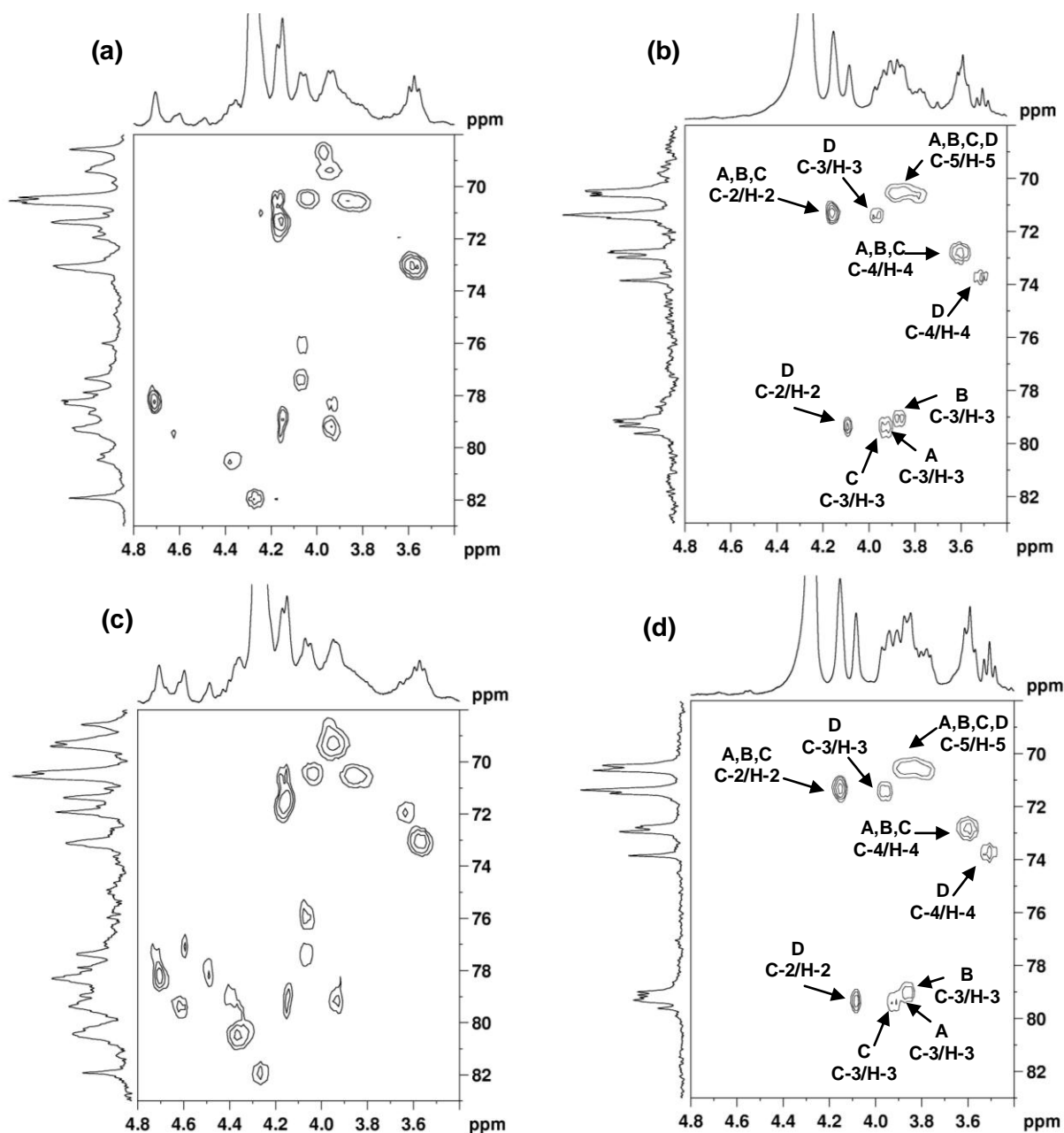


FIGURA 29 – ESPECTROS DE HSQC DA REGIÃO DO ANEL DAS FRAÇÕES NATIVAS: OX-6Sb (a) E OX-6Sc (c) E DESSULFATADAS: OX-6Sb-RD (b) E OX-6Sc-RD (d)

NOTA: Solvente: D₂O (70°C, pH 7); acetona como padrão interno (¹³C= 31,45 ppm, ¹H= 2,225 ppm)
A= [→3)-α-L-Rhap-(1→3)], **B**= [→3)-α-L-Rhap-(1→2)], **C**= [→3)-α-L-Rhap-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)],
D= [→2)-α-L-Rhap-(1→] (ver Figura 30).

Nos espectros de HSQC das frações carboxi-reduzidas e dessulfatadas (OX-6Sb-RD e OX-6Sc-RD) observa-se uma simplificação dos sinais quando comparados com suas respectivas frações nativas (FIGURAS 28 e 29). Na região anomérica os sinais em 102,0/5,20 ppm foram atribuídos a unidades de ramnose 2-ligadas [\rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow)] (FIGURA 30d) (SENCHEKOVÁ *et al.*, 1999; OVOD *et al.*, 2004). Os acoplamentos em 103,2-102,9/5,06 ppm e 103,2-102,9/4,99 ppm foram correspondentes a unidades de ramnose 3-ligadas em ambientes químicos diferentes: ligadas ao C-3 e ao C-2, respectivamente, de outras unidades de ramnose, ou seja, [\rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)] e [\rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)] (FIGURA 30a,b). Os assinalamentos realizados para essas unidades estão de acordo com dados de literatura para unidades repetitivas de ramnose presentes na cadeia O-polissacarídica do lipopolissacarídeo isolado de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* NCPPB 2708 (OVOD *et al.*, 2004), bem como para as heteroramnanas sintetizadas por esta mesma alga descritas por Cassolato *et al.* (2008). Adicionalmente, nos espectros das frações OX-6Sb-RD e OX-6Sc-RD foram observados acoplamentos referentes a tríades de ramnose 3-ligadas [\rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)] (FIGURA 30c), cujos C-3/H-3 apresentam deslocamentos em 79,6/3,90 ppm (OVOD *et al.*, 2004).

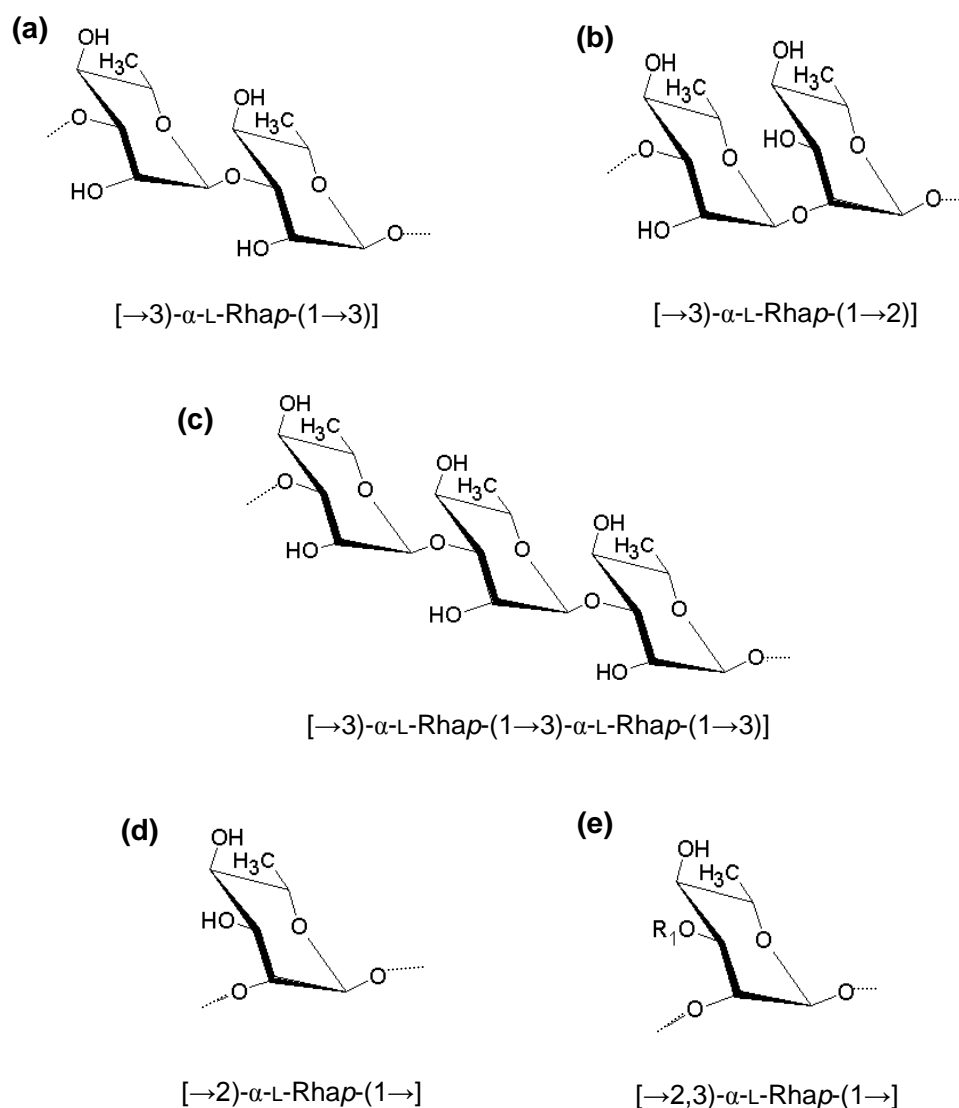


FIGURA 30 – PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH CARBOXI-REDUZIDOS E DESSULFATADOS (OX-6Sb-RD E OX-6Sc-RD)

Nota: R₁= cadeias laterais contendo como terminais não redutores: Glc (formada a partir da carboxi-redução do ácido glucurônico), Rha e Rha 4-sulfato.

Os espectros de ^1H das frações carboxi-reduzidas e dessulfatadas (OX-6Sb-RD e OX-6Sc-RD) apresentaram sinais diferenciados. A fração OX-6Sc-RD apresentou sinal mais intenso em 5,13 e em 5,28 ppm, quando comparado com OX-6Sb-RD (FIGURAS 28 e 31). O sinal em 5,28 ppm corresponde ao H-1 das unidades de ramnose 2-ligada 3-substituída. No espectro de HSQC da fração dessulfatada OX-6Sc-RD foi possível assinalar o acoplamento entre o H-1 em 5,28 ppm e seu correspondente C-1 em 102,0 ppm (FIGURA 28d). Os valores dos

deslocamentos químicos verificados para unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas foram semelhantes aos relatados para tais unidades presentes no O-polissacarídeo de *Pseudomonas syringae* pv. tomato GSPB 483 (KNIREL *et al.*, 1998a). Tal correlação não foi observada no espectro de OX-6Sb-RD, embora esta fração apresente 11,8 mol% de unidades dissubstituídas. Portanto, é possível que em OX-6Sb-RD os pontos de ramificação estejam representados por unidades de ramnose 3-ligadas 2-substituídas, as quais apresentam correlações C-1/H-1 diferentes (C-1/H-1= 100,3/5,17 ppm; KNIREL *et al.*, 1998a,b), (C-1/H-1= 101,3/5,20 ppm; SENCHENKOVA *et al.*, 1999).

No espectro de HMQC do polissacarídeo homogêneo dessulfatado obtido por Cassolato *et al.* (2008) esses acoplamentos foram assinalados em 102,0/5,26 ppm, porém no espectro do produto de degradação controlada de Smith dessulfatado não foi possível verificar esses assinalamentos devido ao menor grau de ramificação em relação ao polímero original.

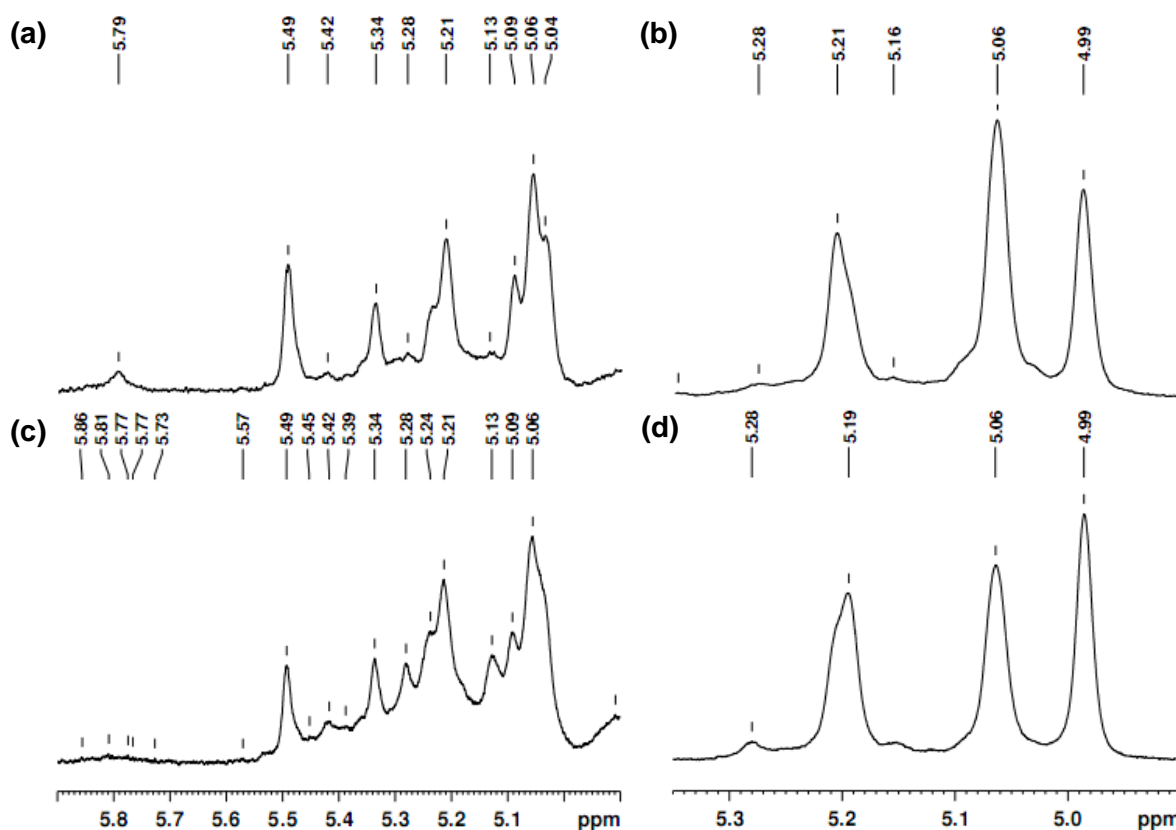


FIGURA 31 – ESPECTROS DE RMN ^1H DA REGIÃO ANOMÉRICA DAS FRAÇÕES NATIVAS: OX-6Sb (a) E OX-6Sc (c) E DESSULFATADAS: OX-6Sb-RD (b) E OX-6Sc-RD (d)

NOTA: Solvente: D_2O (70°C , pH 7); acetona como padrão interno ($^1\text{H} = 2,225$ ppm).

As integrações relativas dos prótons α -anoméricos presentes nos espectros das frações dessulfatadas foram de: 0,05:0,61 e 1,00:0,55 (OX-6Sb-RD) e 0,09:1,00 e 1,00:1,00 (OX-6Sc-RD) para os sinais: 5,28, 5,20 e 5,06, 4,99, respectivamente. Esses sinais são correspondentes a unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas, 2- e 3-ligadas (no C-3 e C-2 de outras unidades de ramnose), respectivamente (FIGURA 30, p. 97). Verifica-se comparando as intensidades dos sinais de prótons que as duas frações apresentam diferenças estruturais, dados esses confirmados pela metilação (TABELA 9, p. 90).

Os deslocamentos químicos das frações carboxi-reduzidas e dessulfatadas (OX-6Sb-RD e OX-6Sc-RD) para as diferentes unidades de ramnose encontradas estão apresentados na Tabela 11.

TABELA 11 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DAS FRAÇÕES DESSULFATADAS OX-6Sb-RD E OX-6Sc-RD

Unidades de ramnose	Deslocamentos químicos (ppm)						Deslocamentos químicos (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
[→3)- α -L-Rhap-(1→3)] ^a	103,2/103,1/102,9	71,5	79,0	72,9/72,8/72,7	70,4	17,9	5,06	4,15	3,90	3,59	3,76-3,88	1,32
[→3)- α -L-Rhap-(1→2)] ^a	103,2/103,1/102,9	71,4	79,2	72,9/72,8/72,7	70,6	17,9	4,99	4,15	3,88	3,61	3,76-3,88	1,28
[→3)- α -L-Rhap-(1→3)- α -L-Rhap-(1→3)] ^a	103,2	71,5	79,6	72,7	70,6	17,9	5,06	4,15	3,90	3,59	3,76-3,88	1,32
[→2)- α -L-Rhap-(1→)] ^a	102,0	79,3	71,5	73,8	70,4	17,9	5,20	4,08	3,94	3,51	3,76-3,88	1,32
[→2,3)- α -L-Rhap-(1→)] ^b	102,0					17,9	5,28					1,28-1,32

^ade acordo com Senchenkova *et al.* (1999), Ovod *et al.* (2004) e Cassolato *et al.* (2008); ^bde acordo com Knirel *et al.* (1998a,b) e Cassolato *et al.* (2008).

5.12 ATIVIDADE ANTITUMORAL

Com base nos dados de caracterização estrutural dos polissacarídeos e na tentativa de correlacionar suas diferenças estruturais com possíveis efeitos biológicos, foram realizados ensaios de citotoxicidade em células humanas tumorais com o objetivo de avaliar o potencial antitumoral desses compostos. Nesses ensaios foram utilizadas duas linhagens de glioma humano (U373MG e U87MG, classificadas em graus diferenciados de progressão maligna). As seguintes frações do polissacarídeo foram avaliadas: a fração bruta (OX-6), a fração degradada de Smith (OX-6S) e as frações purificadas OX-6Sb e OX-6Sc.

A linhagem U87MG é classificada como astrocitoma de grau IV, também denominado glioblastoma multiforme e a linhagem U373MG é classificada como grau III, denominada astrocitoma anaplásico, sendo ambas consideradas tumores malignos.

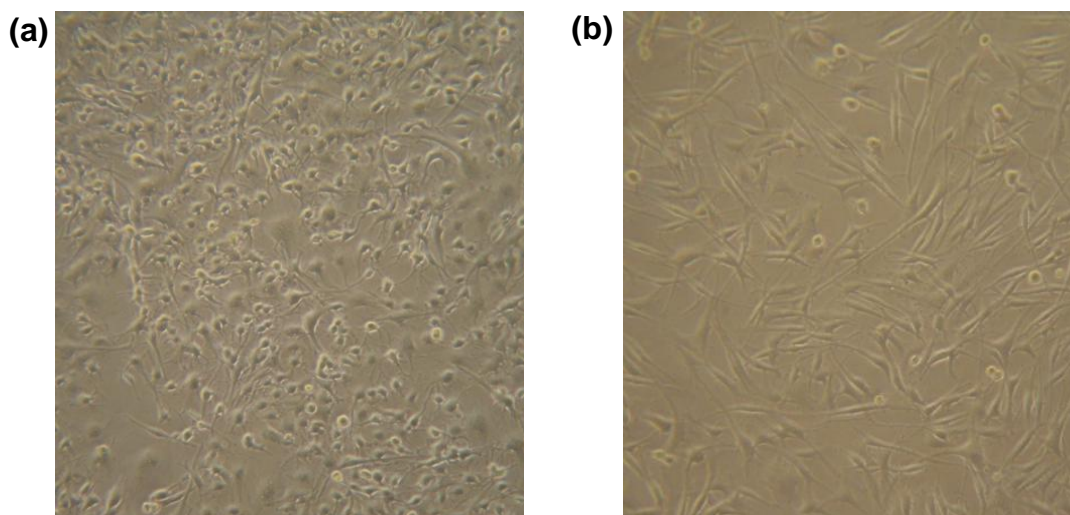


FIGURA 32 – FOTOS DAS LINHAGENS U373MG (a) E U87MG (b)

Nota: aumento de 400x.

5.12.1 Análise da viabilidade de células tumorais

Para determinação da possível atividade antitumoral dos polissacarídeos foi realizado um ensaio de citotoxicidade, utilizando o método de viabilidade celular do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio) segundo Mossmann (1983). Esse método se baseia na dosagem da atividade metabólica de células viáveis utilizando ensaio colorimétrico. Os sais *tetrazolium* (MTT) são reduzidos através de uma reação enzimática que envolve a oxidação do NADH/NADPH catalisada pelo complexo *succinato-tetrazolium redutase* presente somente em células viáveis. Quando reduzidos os sais *tetrazolium* formam o sal *formazan* que é hidrofóbico e colorido (solubilizado pela adição de DMSO), podendo ser quantificado por espectrofotometria.

As linhagens de glioma foram tratadas com as diferentes frações dos polissacarídeos por 24, 48 e 72 horas nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL e a seguir foi realizado a dosagem da atividade metabólica (método MTT).

5.12.1.1 Viabilidade celular de células U373MG após tratamento com polissacarídeos por 24, 48 e 72 horas

Os resultados do ensaio de viabilidade celular após o tratamento das células U373MG com o polissacarídeo por 24 horas estão apresentados na Figura 33. Verificou-se que o tratamento da célula U373MG com as concentrações de 1000 µg/mL da fração bruta (OX-6), degradada de Smith (OX-6S) e OX-6Sc levaram a uma diminuição estatisticamente significativa na viabilidade dessas células tumorais com 24,0, 37,1 e 39,4% de redução da viabilidade, respectivamente. Na concentração de 100 µg/mL somente a fração OX-6 promoveu redução significativa da viabilidade celular (21,2%). Comparando as frações nas mesmas concentrações verifica-se que OX-6, OX-6S e OX-6Sc apresentam diferenças significativas ($p < 0,01$) na concentração de 100 µg/mL quando comparadas com a fração OX-6Sb, verificando que essas três frações tendem a reduzir a viabilidade das células

tumorais de modo similar nesta concentração e pelo tempo de 24 horas, apesar de somente a fração OX-6 apresentar um resultado significativo. Fazendo essa comparação na concentração de 1000 µg/mL observa-se diferença significativa somente entre as frações OX-6S e OX-6Sb ($p<0,05$) e entre OX-6Sc e OX-6Sb ($p<0,01$).

Utilizando a concentração de 10 µg/mL dos polissacarídeos, não foi possível detectar qualquer efeito citotóxico das diferentes frações, percebe-se ainda que as células tenderam a proliferar nessas condições, porém esse aumento não foi significativo. Já a concentração de 100 µg/mL da fração OX-6Sb apresentou aumento na proliferação celular de maneira significativa. De forma geral, observa-se um efeito dose-dependente na redução da viabilidade celular, evidenciado com os resultados obtidos para as condições de tratamento com 100 e 1000 µg/mL nas frações OX-6, OX-6S e OX-6Sc. É importante notar que as frações OX-6, OX-6S e OX-6Sc apresentaram um perfil de citotoxicidade semelhante nas três concentrações avaliadas e pelo tempo de 24 horas de tratamento em células U373MG, não apresentando diferenças significativas entre si quando comparadas nas mesmas concentrações.

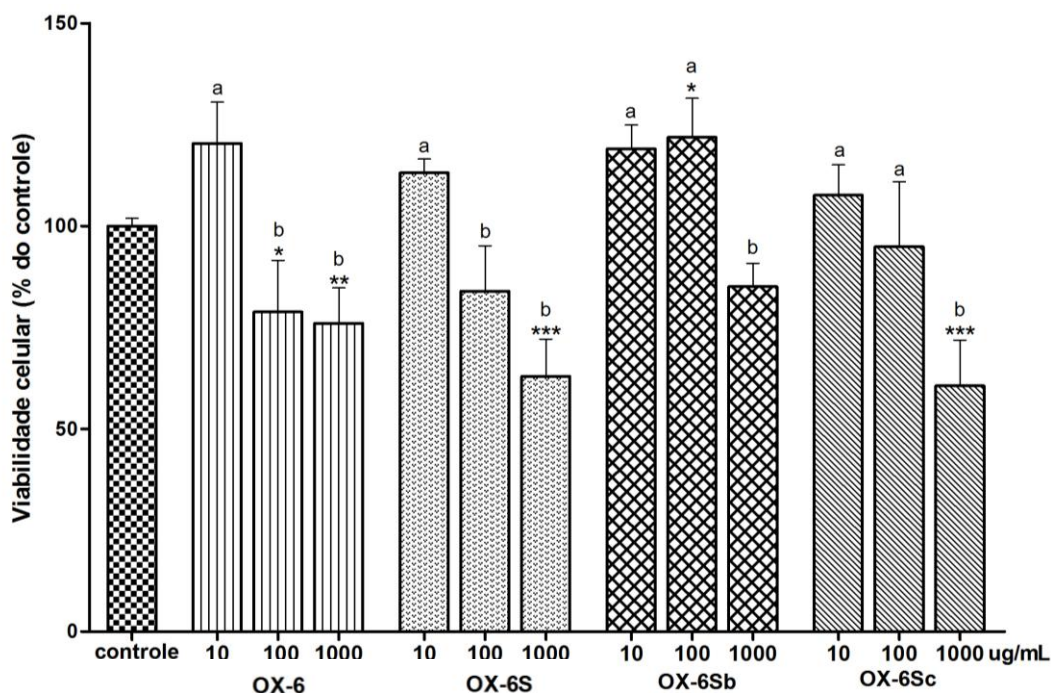


FIGURA 33 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U373MG APÓS TRATAMENTO COM OS POLISSACARÍDEOS POR 24 HORAS

NOTA: Viabilidade das células U373MG após o tratamento com 10, 100 e 1000 µg/mL de polissacarídeo no tempo de 24 horas de exposição. A condição controle é representada como 100% de viabilidade. Os dados mostrados são relativos a 4 experimentos independentes realizados em triplicatas. A significância estatística mostrada é referente à condição controle [ANOVA seguido de teste Tukey: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$]; Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações de uma mesma fração individual ($p < 0,05$).

Em relação ao tratamento das células U373MG com os diferentes polissacarídeos pelo tempo de 48 horas, verificou-se que todas as frações avaliadas na concentração de 1000 µg/mL proporcionaram redução significativa na viabilidade celular quando comparadas às células mantidas na condição controle. Especificamente a diminuição de viabilidade das células tumorais foi de: OX-6= 26,0%, OX-6S= 41,9%, OX-6Sb= 27,3% e OX-6Sc= 44,3%, não havendo diferença significativa entre as frações nesta concentração. Este resultado pode ser verificado na Figura 34.

É interessante notar que no tratamento das células U373MG com os diferentes polissacarídeos na concentração de 100 µg/mL, somente a fração OX-6Sc foi capaz de promover redução significativa da viabilidade celular, em torno de

24,0%. Entretanto, quando essa fração é comparada com as outras frações nesta mesma concentração, observa-se que há diferença significativa somente entre OX-6 ($p<0,01$) e OX-6Sb ($p<0,001$), verificando que a fração OX-6Sc se comporta igual a fração OX-6S (12,1% de redução) na concentração de 100 µg/mL.

Assim como observado para o tratamento das células no tempo de 24 horas, observa-se também após o tratamento por 48 horas uma tendência de efeito dose dependente das seguintes frações de polissacarídeos: OX-6, OX-6S e OX-6Sc, apesar das frações OX-6 e OX-6S não produzirem nenhum efeito citotóxico quando utilizados em menores concentrações (dose de 10 µg/mL).

Nota-se que o tratamento das células U373MG com os diferentes polissacarídeos na concentração de 1000 µg/mL promoveu uma redução na viabilidade celular significativa quando comparada com as menores concentrações de 10 e 100 µg/mL da mesma fração ($p<0,05$). Por fim, todas as frações polissacarídicas não demonstraram diferenças estatísticas entre si nas concentrações de 10 e 1000 µg/mL, sendo observado apenas na concentração de 100 µg/mL entre as frações OX-6 e OX-6Sc e entre OX-6Sb e OX-6Sc, como descrito acima. Assim, verifica-se que as frações OX-6, OX-6S e OX-6Sb tiveram um comportamento semelhante em todas as concentrações, porém as frações OX-6S e OX-6Sc também não apresentaram diferenças entre si nas três concentrações e foram mais eficazes na redução da viabilidade das células U373MG pelo tempo de 48 horas.

Ye *et al.* (2008) verificaram que frações polissacarídicas altamente sulfatadas (~23% sulfato) obtidas da alga parda *S. pallidum* apresentaram redução na viabilidade celular de células HepG2 (hepatoma humano), A549 (câncer de pulmão humano) e MGC-803 (câncer gástrico), de maneira dose-dependente pelo tempo tratamento de 48 horas. Na concentração de 1000 µg/mL a inibição foi de 62,2%, 64,8% e 79,6%, para as células HepG2, A549 e MGC-803, respectivamente.

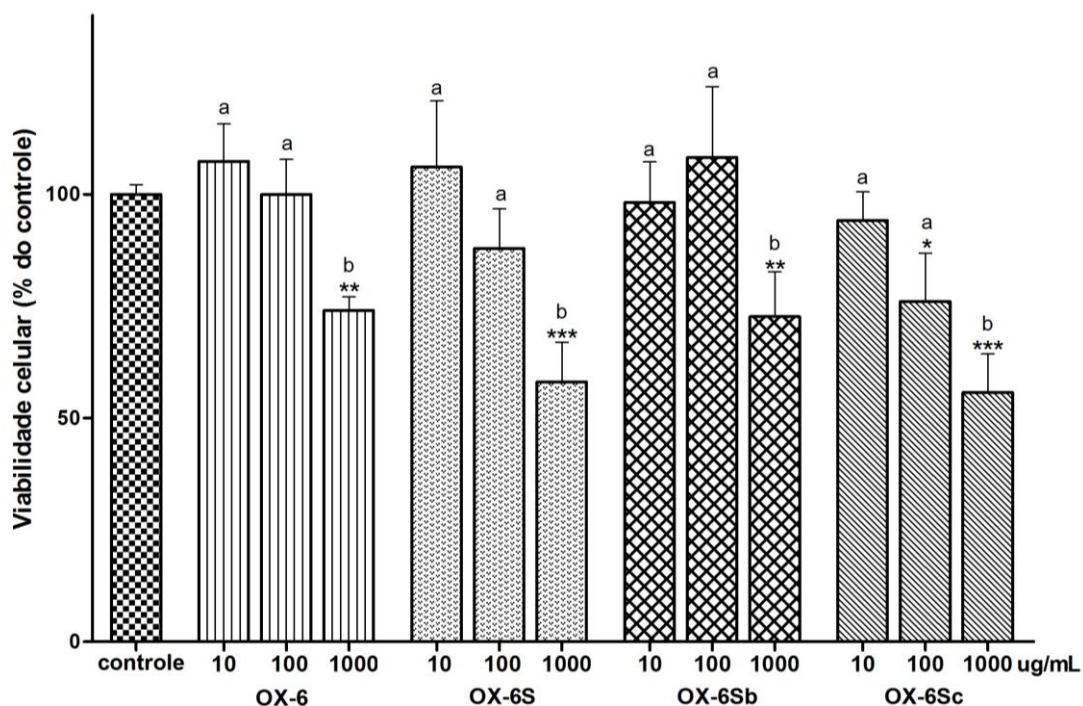


FIGURA 34 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U373MG APÓS TRATAMENTO COM OS POLISSACARÍDEOS POR 48 HORAS

NOTA: Viabilidade das células U373MG após o tratamento com 10, 100 e 1000 µg/mL de polissacarídeo no tempo de 48 horas de exposição. A condição controle é representada como 100% de viabilidade. Os dados mostrados são relativos a 4 experimentos independentes realizados em triplicatas. A significância estatística mostrada é referente à condição controle [ANOVA seguido de teste Tukey: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$]; Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações de uma mesma fração individual ($p < 0,05$).

Em relação ao tratamento das células U373MG com os diferentes polissacarídeos pelo tempo de 72 horas verificou-se que todas as frações polissacarídicas avaliadas foram mais citotóxicas nessas condições, apresentando uma tendência de resposta dose-dependente para as frações OX-6, OX-6S e OX-6Sc (FIGURA 35). O tratamento das células com a fração OX-6S nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL promoveu redução significativa da viabilidade da ordem de 30,7%, 41,5% e 50,7% enquanto que utilizando a fração OX-6Sc a redução foi em torno de 19,1%, 26,3% e 54,7%, respectivamente. Em relação ao tratamento das células com a fração OX-6 os resultados mostram que houve redução significativa da viabilidade celular de 17,7 e 31,5% no tratamento com as concentrações de 100 e 1000 µg/mL, respectivamente. Já, utilizando a fração OX-6Sb a redução de viabilidade significativa foi de 24,8 e 24,1% nas

concentrações de 10 e 100 µg/mL, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Costa *et al.* (2010), onde diferentes espécies de algas (vermelhas, pardas e verdes) apresentaram inibição da proliferação de células HeLa da ordem de 40,2 a 67,5% após 72 horas de incubação com os polissacarídeos nas concentrações de 10 a 2000 µg/mL.

Comparando os efeitos citotóxicos da fração degradada de Smith (OX-6S) e sua fração de origem (OX-6) nas mesmas concentrações pelo tempo de 72 horas, nota-se uma diferença significativa nas doses de 100 µg/mL ($p < 0,001$) e 1000 µg/mL ($p < 0,01$), verificando que após a degradação controlada de Smith o polímero tornou-se mais eficaz na redução da viabilidade celular. Este fato sugere que a redução da massa molecular juntamente com o maior teor de grupos sulfato da fração OX-6S possa aumentar os efeitos citotóxicos para essa linhagem. Porém, é importante ressaltar que essa diferença entre a fração bruta e a degrada de Smith só ocorre no tempo de exposição de 72 horas.

Por outro lado, a fração purificada OX-6Sc em comparação com sua fração de origem OX-6S, não apresentou diferença significativa na citotoxicidade em nenhuma das concentrações, sendo, entretanto significativa quando comparada com a fração OX-6 na dose de 1000 µg/mL ($p < 0,01$). Esse resultado já havia sido observado no tempo de 48 horas, onde as frações OX-6S e OX-6Sc apresentaram comportamentos iguais para todas as concentrações, sendo a fração OX-6Sc na concentração de 100 µg/mL mais citotóxica para as células U373MG ($p < 0,01$) que a fração bruta OX-6. No tempo de 72 horas a fração OX-6Sc, não foi mais citotóxica que sua fração de origem (OX-6S), porém apresentou um efeito maior que a fração purificada OX-6Sb (com diferença significativa na dose de 1000 µg/mL), indicando que outros fatores possam influenciar na resposta celular, tais como as diferenças estruturais. A fração OX-6Sc apresentou comportamento mais citotóxico que a fração OX-6Sb na concentração de 100 µg/mL já no tempo de 48 horas.

Além disso, no tempo de 72 horas, a fração OX-6Sb apresentou diferença significativa nas concentrações de 100 ($p < 0,05$) e 1000 µg/mL ($p < 0,001$) quando comparada com sua fração de origem OX-6S, sugerindo que a menor massa molecular, bem como o menor grau de sulfatação da fração OX-6Sb possam ter sido responsáveis pela menor atividade desta fração.

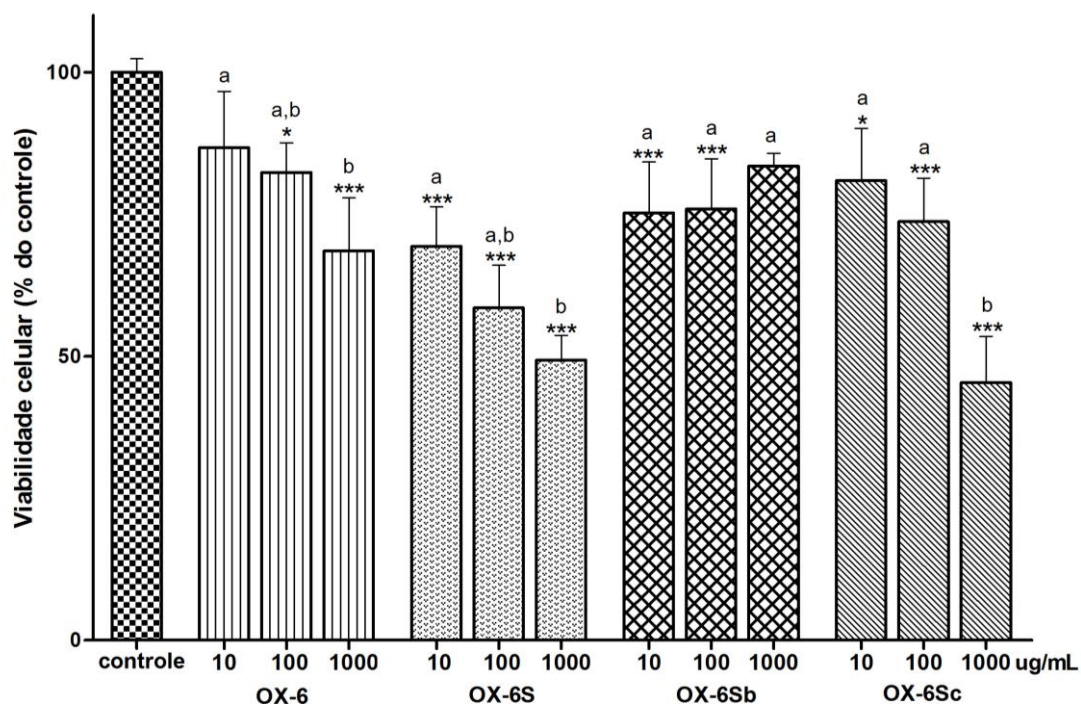


FIGURA 35 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U373MG APÓS TRATAMENTO COM OS POLISSACARÍDEOS POR 72 HORAS

NOTA: Viabilidade das células U373MG após o tratamento com 10, 100 e 1000 µg/mL de polissacarídeo no tempo de 72 horas de exposição. A condição controle é representada como 100% de viabilidade. Os dados mostrados são relativos a 4 experimentos independentes realizados em triplicatas. A significância estatística mostrada é referente à condição controle [ANOVA seguido de teste Tukey: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$]; Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações de uma mesma fração individual ($p < 0,05$).

Comparando os ensaios de viabilidade celular nos três tempos (24, 48 e 72h) para a linhagem U373MG, verifica-se que as frações polissacarídicas OX-6S e OX-6Sc foram as que apresentaram uma resposta citotóxica mais eficaz, principalmente na concentração de 1000 µg/mL com redução na viabilidade variando de 37,1 a 50,7% (OX-6S) e 39,4 a 54,7% (OX-6Sc) (FIGURAS 33, 34, 35). Esses resultados sugerem que a redução na massa molecular do polissacarídeo, ocasionado pelo método de degradação controlada de Smith, além de características estruturais presentes nas frações OX-6S e OX-6Sc podem ter sido eficazes para obtenção de uma fração polissacarídica que apresenta propriedades citotóxicas mais pronunciadas na linhagem de glioma humano U373MG. É interessante notar que, a fração de maior rendimento (OX-6Sc), obtida após eluição com NaCl 1,5M por cromatografia de troca iônica, demonstrou o mesmo perfil de

ação de sua fração de origem (OX-6S) na redução da viabilidade celular, visto que a fração OX-6Sc compõe majoritariamente a fração de origem OX-6S (51%) e provavelmente por este fato possuam atividades citotóxicas similares em células U373MG. Já a fração eluída com NaCl 1M (OX-6Sb), que apresentou perfil homogêneo em HPSEC-MALLS, não foi tão eficaz na capacidade de promover redução de viabilidade celular da linhagem U373MG quanto a fração OX-6Sc, indicando que as diferenças estruturais entre esses polímeros podem ter influenciado as respostas celulares.

Para verificar se o efeito citotóxico das frações polissacarídicas foi tempo-dependente, todas as frações na dose de 1000 µg/mL, foram analisadas estatisticamente nos tempos de 24, 48 e 72 horas (FIGURA 29).

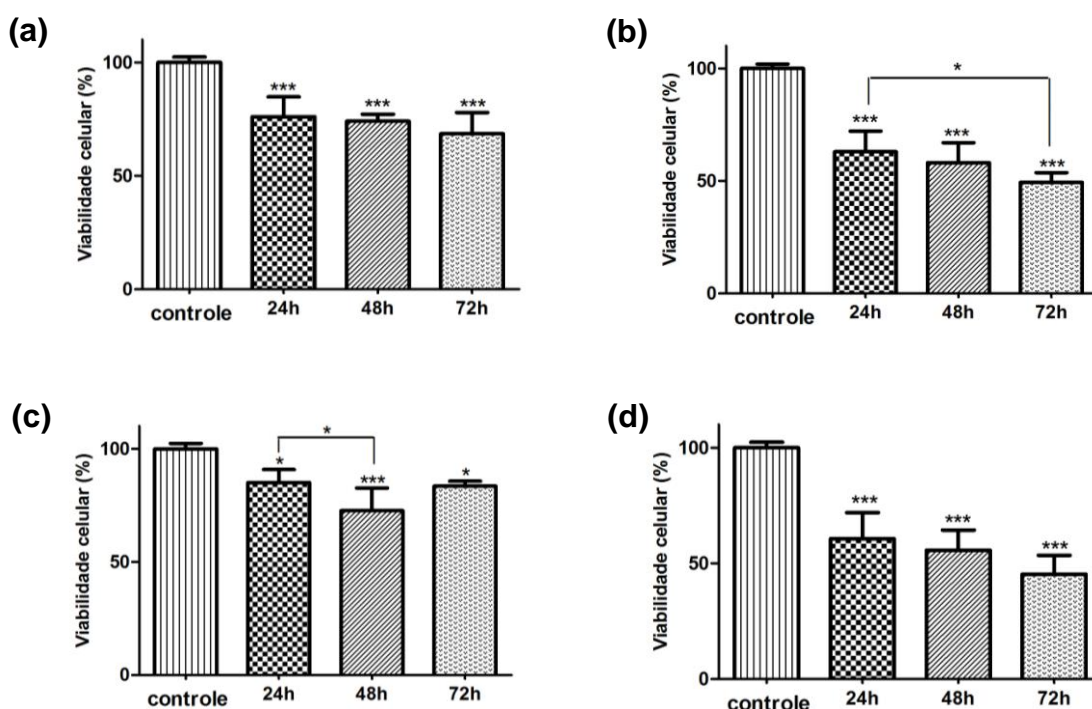


FIGURA 36 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U373MG TRATADAS COM 1000 µg/mL DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS: OX-6 (a), OX-6S (b), OX-6Sb (c) E OX-6Sc (d)

NOTA: Viabilidade das células U373MG após o tratamento com 1000 µg/mL de polissacarídeo no tempo de 24, 48 e 72 horas de exposição. A condição controle é representada como 100% de viabilidade. Os dados mostrados são relativos a 4 experimentos independentes realizados em triplicatas. A significância estatística mostrada é referente à condição controle [ANOVA seguido de teste Tukey: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$].

Embora todas as frações tenham apresentado uma redução significativa da viabilidade celular no tratamento com 1000 $\mu\text{g/mL}$ em todos os tempos, somente a fração OX-6S apresentou diferença significativa entre os tempos de incubação de 24 para 72 horas, ilustrando a diferença abordada na discussão anterior entre as frações OX-6 e OX-6S somente no tempo de 72 horas. O tratamento com a fração OX-6Sb foi significativo entre os tempos de 24 e 48 horas.

Para verificar se esse perfil foi semelhante na concentração intermediária, esta mesma análise foi realizada com todas as frações na dose de 100 $\mu\text{g/mL}$ nos tempos de 24, 48 e 72 horas (FIGURA 37).

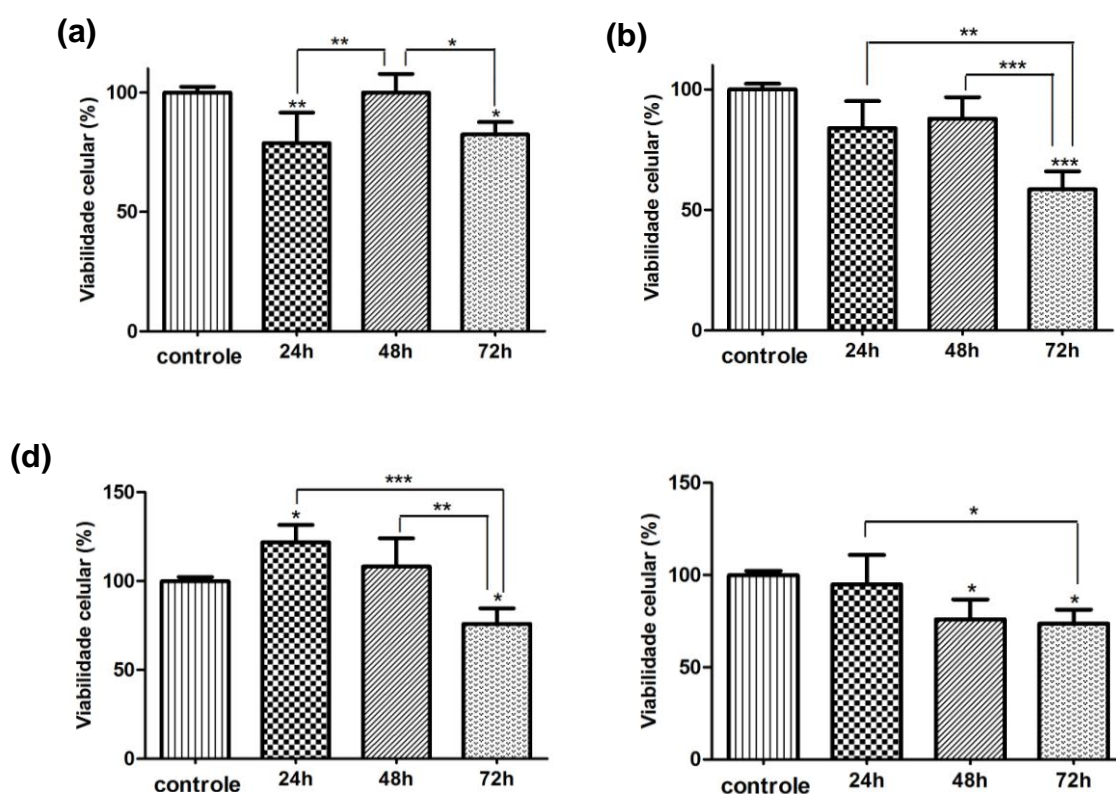


FIGURA 37 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U373MG TRATADAS COM 100 $\mu\text{g/mL}$ DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS: OX-6 (a), OX-6S (b), OX-6Sb (c) E OX-6Sc (d)

NOTA: Viabilidade das células U373MG após o tratamento com 100 $\mu\text{g/mL}$ de polissacarídeo no tempo de 24, 48 e 72 horas de exposição. A condição controle é representada como 100% de viabilidade. Os dados mostrados são relativos a 4 experimentos independentes realizados em triplicatas. A significância estatística mostrada é referente à condição controle [ANOVA seguido de teste Tukey: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$].

Para a concentração de 100 µg/mL os resultados foram diferenciados, as frações OX-6S e OX-6Sb apresentaram diferença significativa entre os tempos de incubação de 24 e 72 horas e 48 e 72 horas, verificando que o tempo de 72 horas de exposição às frações polissacarídicas foi eficaz na redução da viabilidade celular das células U373MG. Porém como verificado na Figura 36, a fração OX-6Sb na concentração de 1000 µg/mL não demonstrou essa redução no tempo de 72 horas. A fração OX-6Sc apresentou diferença significativa entre os tempos de incubação de 24 para 72 horas e a fração OX-6 na concentração de 100 µg/mL apresentou diferenças nos tempos de 24 e 48 horas e 48 e 72 horas.

5.12.1.2 Viabilidade celular de células U87MG após tratamento com polissacarídeos por 24, 48 e 72 horas

Os resultados do ensaio de viabilidade celular após o tratamento das células U87MG com os polissacarídeos por 24 horas estão apresentados na Figura 38. Verificou-se que somente o tratamento com a concentração de 1000 µg/mL da fração bruta (OX-6) reduziu significativamente a viabilidade das células U87MG em 56,7%. Apesar de somente OX-6 demonstrar redução significativa, comparando as frações nesta mesma concentração não é observado diferença significativa entre nenhuma delas. Com exceção da fração OX-6Sb na dose de 10 µg/mL, todas as frações demonstraram uma tendência de redução da viabilidade celular dose-dependente, porém não significativa.

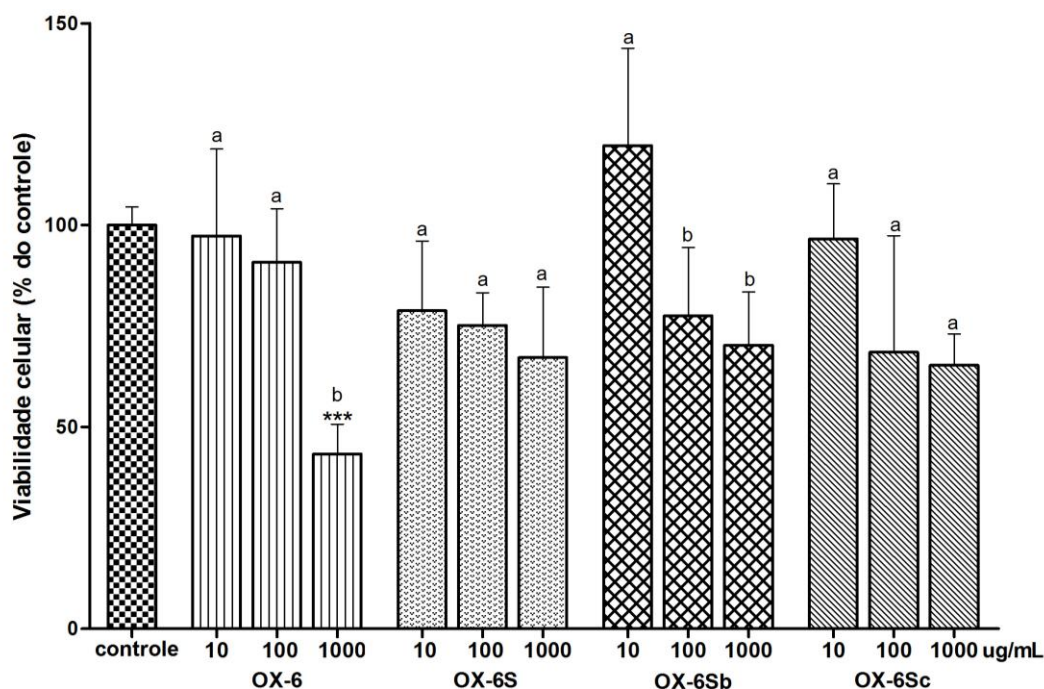


FIGURA 38 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U87MG APÓS TRATAMENTO COM OS POLISSACARÍDEOS POR 24 HORAS

NOTA: Viabilidade das células U87MG após o tratamento com 10, 100 e 1000 µg/mL de polissacarídeo no tempo de 24 horas de exposição. A condição controle é representada como 100% de viabilidade. Os dados mostrados são relativos a 4 experimentos independentes realizados em triplicatas. A significância estatística mostrada é referente à condição controle [ANOVA seguido de teste Tukey: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$]; Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações de uma mesma fração individual ($p < 0,05$).

Em relação ao tratamento das células U87MG com os diferentes polissacarídeos pelo tempo de 48 horas, todas as frações nas três concentrações avaliadas reduziram significativamente a viabilidade celular dessa linhagem tumoral, com 30,4 a 65,0% de redução na viabilidade dessas células (FIGURA 39). As concentrações mais citotóxicas das frações OX-6 e OX-6S foram 100 e 1000 µg/mL, com 53,2 e 54,9% de redução da viabilidade celular para a dose de 100 µg/mL, respectivamente e para a dose de 1000 µg/mL redução de 65,0 e 56,3%, respectivamente. Já as frações OX-6Sb e OX-6Sc demonstraram uma maior citotoxicidade na concentração de 1000 µg/mL, com 64,8 e 57,8% de redução na viabilidade celular, respectivamente. Para a concentração de 100 µg/mL as frações

OX-6Sb e OX-6Sc proporcionaram redução na viabilidade das células U87MG da ordem de 37,2 e 31,4%, respectivamente.

Comparando as frações nas mesmas concentrações verifica-se diferença significativa entre as frações OX-6 e OX-6Sb ($p<0,05$), OX-6 e OX-6Sc ($p<0,001$), OX-6S e OX-6Sb ($p<0,01$), OX-6S e OX-6Sc ($p<0,001$) na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Assim como verificado para as células U373MG no tempo de 48 horas, nas concentrações de 10 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ todas as frações demonstraram o mesmo comportamento citotóxico, não apresentando diferenças significativas entre si. Sendo assim, é interessante notar que as frações OX-6 e OX-6S apresentaram comportamentos similares na redução da viabilidade celular de U87MG em todas as concentrações pelo tempo de 48 horas. Adicionalmente este fato também ocorre com as frações purificadas OX-6Sb e OX-6Sc, porém as frações OX-6 e OX-6S demonstram-se mais citotóxicas que as frações anteriores na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Por outro lado, Yuan e Song (2005) verificaram que oligossacarídeos de *kappa*-carragenana apresentaram atividade antiproliferativa mais acentuada que seus polissacarídeos de origem em linhagens neoplásicas humanas (KB, BGC e HeLa) nas concentrações de 500, 250 e 125 $\mu\text{g/mL}$.

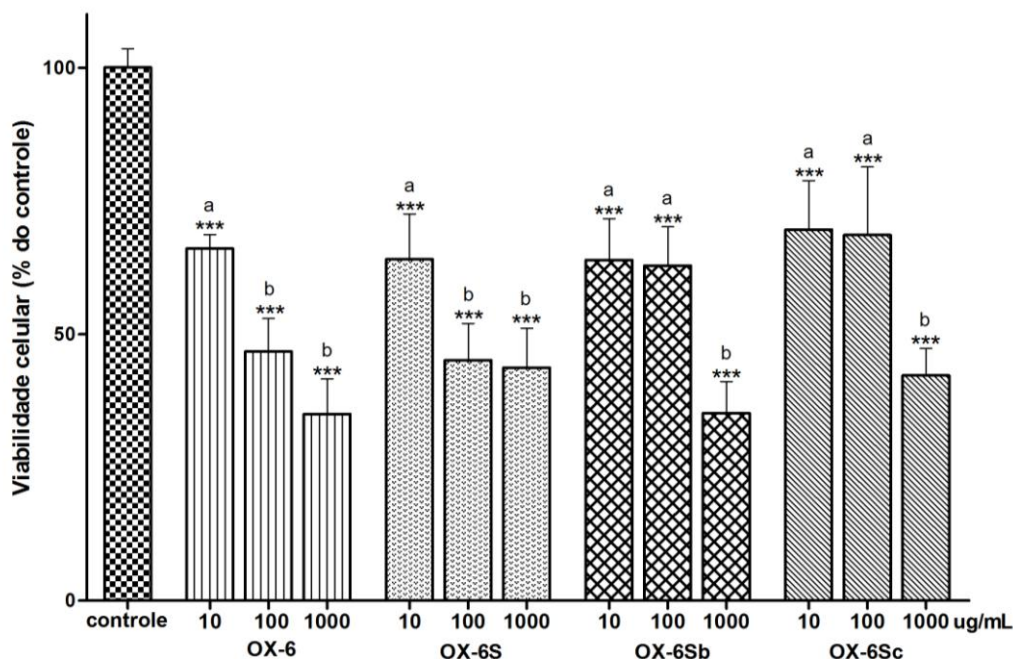


FIGURA 39 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U87MG APÓS TRATAMENTO COM OS POLISSACARÍDEOS POR 48 HORAS

NOTA: Viabilidade das células U87MG após o tratamento com 10, 100 e 1000 µg/mL de polissacarídeo no tempo de 48 horas de exposição. A condição controle é representada como 100% de viabilidade. Os dados mostrados são relativos a 4 experimentos independentes realizados em triplicatas. A significância estatística mostrada é referente à condição controle [ANOVA seguido de teste Tukey: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$]; Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações de uma mesma fração individual ($p < 0,05$).

No tratamento das células U87MG pelo tempo de 72 horas com os polissacarídeos observa-se que a redução significativa da viabilidade celular se manteve no tratamento com todas as frações nas três concentrações avaliadas. A redução da viabilidade das células tumorais variou de 13,6 a 81,7% (FIGURA 40). As frações OX-6, OX-6S e OX-6Sc apresentaram uma resposta citotóxica dose-dependente. Comparando essas três frações nas mesmas concentrações verifica-se diferença significativa apenas na concentração de 1000 µg/mL, para as frações OX-6 (81,7%) e OX-6S (67,7%) ($p < 0,01$) e para OX-6S (67,7%) e OX-6Sc (78,7%) ($p < 0,05$), verificando que a fração bruta (OX-6) e a fração purificada OX-6Sc reduziram de maneira similar a viabilidade celular da linhagem tumoral U87MG no tempo de 72 horas (81,7 e 78,7% de redução, respectivamente).

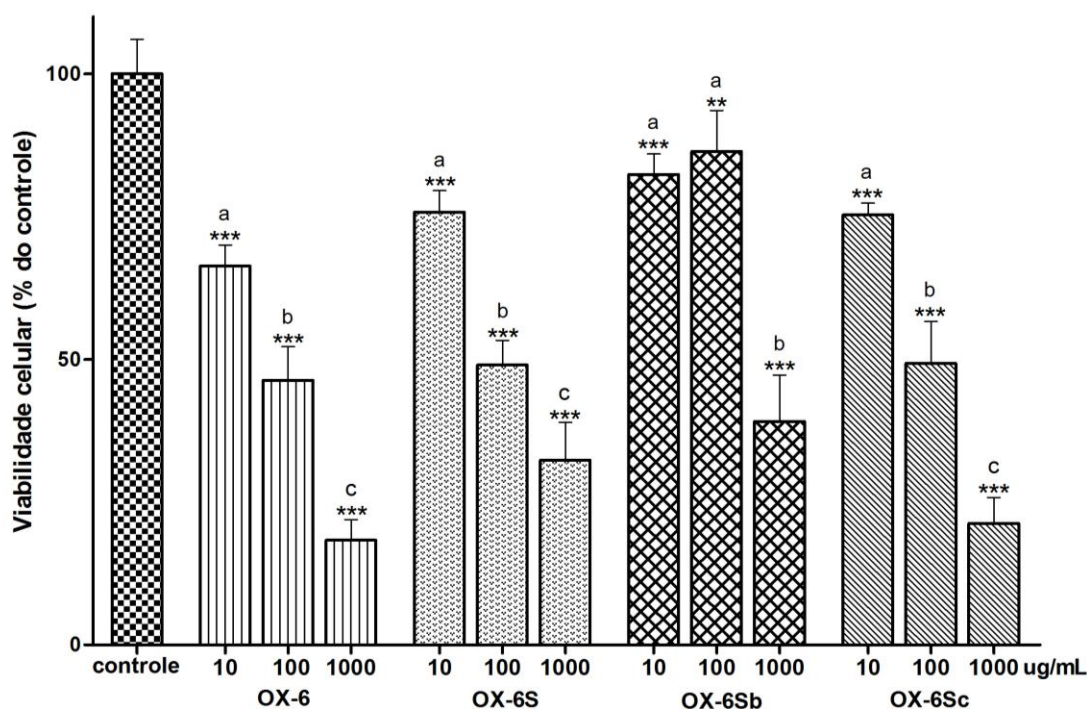


FIGURA 40 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U87MG APÓS TRATAMENTO COM OS POLISSACARÍDEOS POR 72 HORAS

NOTA: Viabilidade das células U87MG após o tratamento com 10, 100 e 1000 µg/mL de polissacarídeo no tempo de 72 horas de exposição. A condição controle é representada como 100% de viabilidade. Os dados mostrados são relativos a 4 experimentos independentes realizados em triplicatas. A significância estatística mostrada é referente à condição controle [ANOVA seguido de teste Tukey: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$]; Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações de uma mesma fração individual ($p < 0,05$).

Comparando os resultados obtidos nos tempos de 24, 48 e 72 horas para a linhagem U87MG, verifica-se que a partir do tempo de incubação de 48 horas todas as frações nas três concentrações avaliadas apresentaram efeito citotóxico significativo na redução da viabilidade celular dessa linhagem tumoral. Ademais, todas as frações avaliadas foram mais eficientes na redução da viabilidade celular quando presentes na concentração de 1000 µg/mL, mostrando um efeito dose-dependente. As frações OX-6 e OX-6Sc demonstraram uma resposta citotóxica mais eficaz com redução da viabilidade das células U87MG variando de 56,7 a 81,7% (OX-6) e 34,7 a 78,7% (OX-6Sc) na concentração de 1000 µg/mL.

Verificando o efeito do tempo de incubação na redução da viabilidade celular para todas as frações na concentração de 1000 µg/mL observa-se que somente a fração OX-6Sc apresentou um resultado significativo tempo-dependente, com

redução significativa da viabilidade celular conforme o aumento do tempo de incubação (FIGURA 41). As frações OX-6S e OX-6Sb promoveram diferença significativa entre os tempos de 24 e 48 horas e 24 e 72 horas. Já a fração OX-6 apresentou diferença significativa entre os tempos de 24 e 72 horas e 48 e 72 horas.

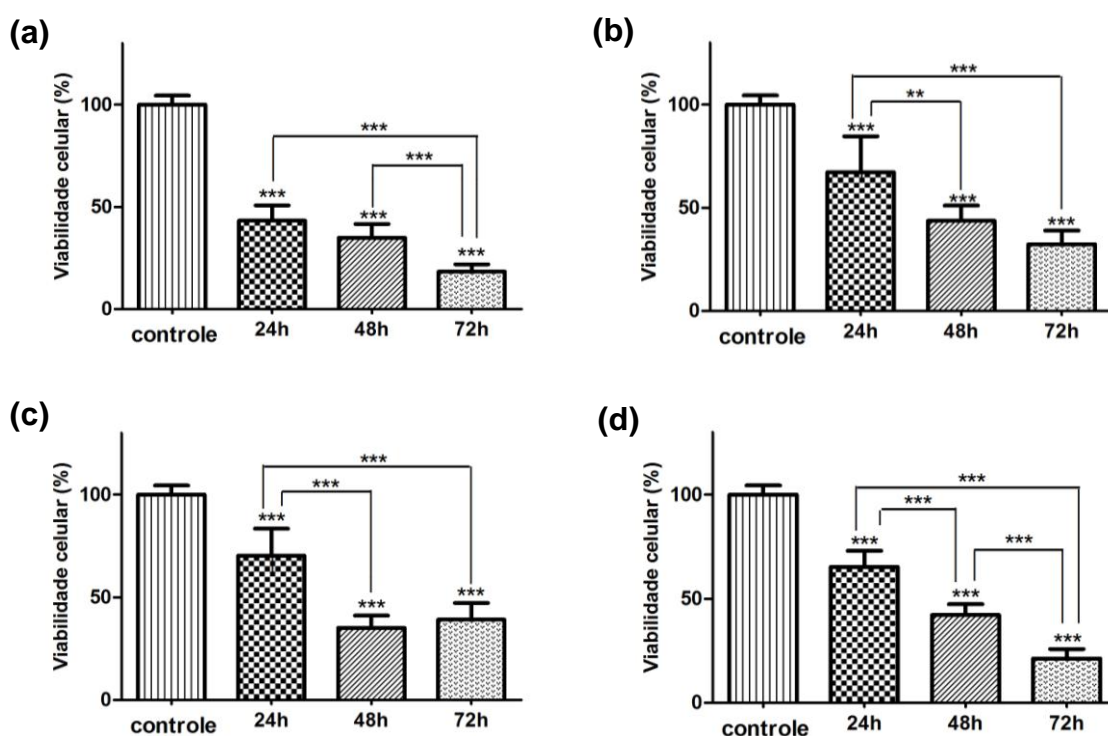


FIGURA 41 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U87MG TRATADAS COM 1000 µg/mL DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS: OX-6 (a), OX-6S (b), OX-6Sb (c) E OX-6Sc (d)

NOTA: Viabilidade das células U87MG após o tratamento com 1000 µg/mL de polissacarídeo no tempo de 24, 48 e 72 horas de exposição. A condição controle é representada como 100% de viabilidade. Os dados mostrados são relativos a 4 experimentos independentes realizados em triplicatas. A significância estatística mostrada é referente à condição controle [ANOVA seguido de teste Tukey: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$].

Para verificar se esse mesmo perfil se repetia na concentração intermediária, todas as frações na dose de 100 µg/mL, foram analisadas estatisticamente nos tempos de 24, 48 e 72 horas (FIGURA 42).

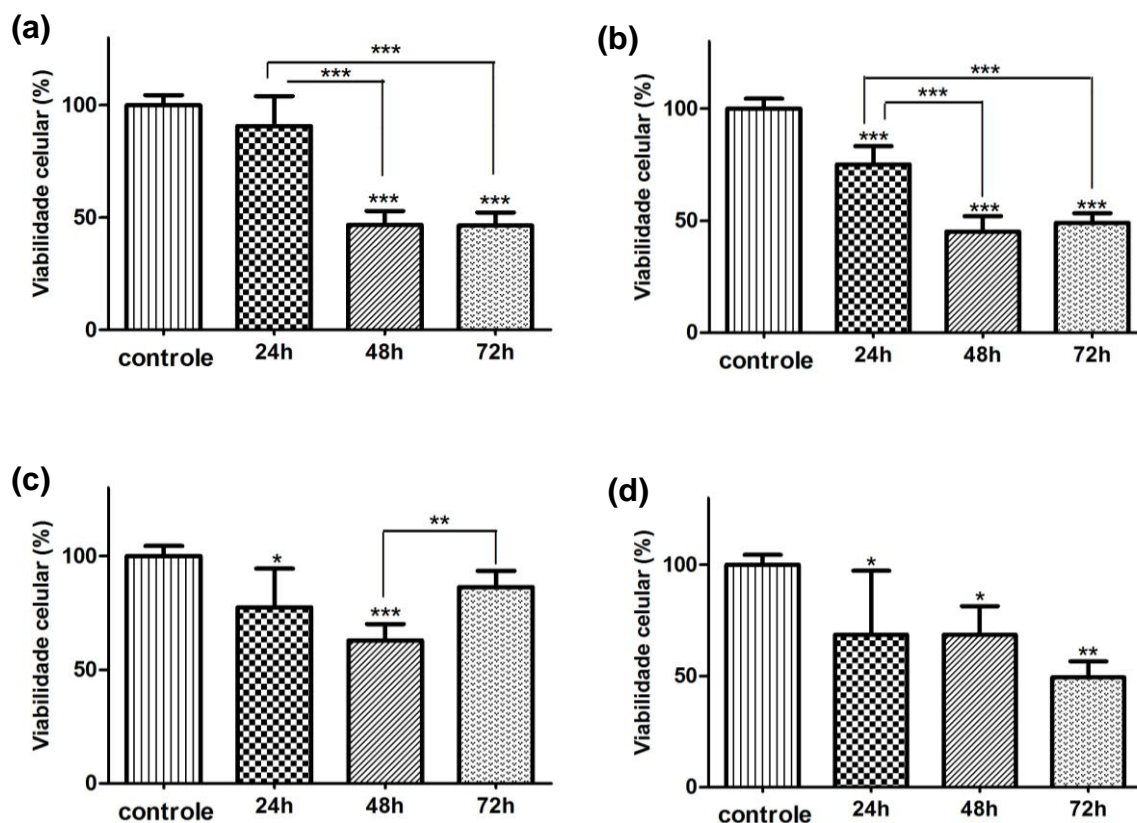


FIGURA 42 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U87MG TRATADAS COM 100 µg/mL DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS: OX-6 (a), OX-6S (b), OX-6Sb (c) E OX-6Sc (d)

NOTA: Viabilidade das células U87MG após o tratamento com 100 µg/mL de polissacarídeo no tempo de 24, 48 e 72 horas de exposição. A condição controle é representada como 100% de viabilidade. Os dados mostrados são relativos a 4 experimentos independentes realizados em triplicatas. A significância estatística mostrada é referente à condição controle [ANOVA seguido de teste Tukey: *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$].

As frações OX-6 e OX-6S na concentração de 100 µg/mL apresentaram diferenças significativas entre os tempos de 24 e 48 horas e entre 24 e 72 horas. Já a fração OX-6Sb apresentou diferença entre os tempos de 48 e 72 horas, porém com o aumento da viabilidade das células tumorais U87MG no tempo de 72 horas.

5.12.1.3 Análise comparativa dos resultados de viabilidade celular das linhagens U373MG e U87MG

Comparando os ensaios de viabilidade celular das linhagens U373MG e U87MG é possível observar diferentes respostas para cada linhagem. A linhagem U373MG mostrou-se mais resistente à ação dos polissacarídeos com redução máxima da viabilidade celular de 54,7% no tempo de 72 horas, enquanto a linhagem U87MG apesar de ser classificada com um grau mais agressivo de malignidade (grau IV) em relação à U373MG (grau III) apresentou redução na viabilidade celular de até 81,7% em 72 horas, além de demonstrar redução acima de 50% já no tempo de 48 horas.

Com relação às frações polissacarídicas avaliadas, a linhagem U373MG apresentou maior redução da viabilidade celular quando tratada com a fração degradada de Smith (OX-6S) e a fração purificada OX-6Sc, enquanto a linhagem U87MG foi mais sensível à fração bruta (OX-6) e a fração purificada OX-6Sc, sendo a concentração de 1000 µg/mL a mais citotóxica para ambas as linhagens. Apesar da fração bruta (OX-6) apresentar massa molecular mais elevada e menor teor de sulfato que as outras frações, ainda assim apresentou uma resposta citotóxica eficaz para a linhagem U87MG. Já a fração OX-6Sc manteve o efeito citotóxico bastante pronunciado nas células U87MG, o que corrobora com os resultados obtidos para as células U373MG, constatando assim que a fração OX-6Sc foi bastante citotóxica para as duas linhagens de glioma humano utilizadas.

É importante ressaltar que após o tratamento das células de glioma com as diferentes frações polissacarídicas, em qualquer concentração, não foi possível verificar através de microscópio óptico indício de células mortas, ou seja, a presença de células soltas. Ao invés disso, foi verificado poços com menor confluência. Isso sugere que talvez as frações polissacarídicas estejam inibindo a proliferação celular dessas células tumorais, ao invés de sua morte. Essa hipótese poderia ter sido confirmada por análise da progressão das células pelas diferentes fases do ciclo celular (análise por citometria de fluxo), onde seria possível verificar se as frações polissacarídicas estavam alterando a percentagem de células em uma determinada

fase do ciclo ou mesmo promovendo sua parada. A análise de ciclo celular foi realizada, porém devido a problemas na leitura do citômetro, não foi possível obter os resultados.

Apesar de não obter os dados de citometria, há grande possibilidade de que os polissacarídeos estejam interrompendo o ciclo celular, justificado também pelo fato de que a linhagem tumoral mais agressiva U87MG foi mais sensível ao tratamento com os polissacarídeos que a linhagem U373MG. Esse resultado tem se reproduzido em outros trabalhos realizados no nosso grupo (ainda não publicados), onde células U87MG respondem a drogas citotóxicas já em baixas concentrações parando a proliferação, porém têm se mostrado mais resistentes à morte celular. Já as células U373MG necessitam de doses mais elevadas da droga para causar efeitos citotóxicos, porém nessas condições é mais susceptível à morte celular.

6 CORRELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA DAS HETERORAMNANAS SULFATADAS E ATIVIDADE ANTITUMORAL

As heteroramnanas sulfatadas (OX-6) isoladas de *G. oxysperma* após degradação controlada de Smith (OX-6S) e fracionamento cromatográfico originaram duas subfrações principais: OX-6Sb e OX-6Sc.

De acordo com os resultados encontrados nos ensaios de viabilidade de células tumorais cerebrais, as frações que apresentaram maior efeito citotóxico foram a fração OX-6 para a linhagem U87MG, a fração OX-6S para a linhagem U373MG e a fração OX-6Sc em ambas as linhagens.

Considerando os resultados diferenciais em termos de citotoxicidade em linhagens U87MG e U373MG e as características estruturais dos polímeros avaliados, é possível traçar alguns parâmetros relevantes entre atividade citotóxica e estrutura química em termos de: grau de sulfatação, posicionamento de grupos sulfato e massa molecular.

Em relação à linhagem U87MG deve-se considerar que o processo de degradação controlada de Smith conduzido com as heteroramnanas sulfatadas de *G. oxysperma* originou majoritariamente um produto de degradação (OX-6Sc) de menor massa molecular (251 kDa) altamente sulfatado (41%). A fração OX-6Sc é composta majoritariamente por unidades de ramnose 3-ligadas 4-sulfatadas e ramnose 2-ligadas 3,4-sulfatadas. Deste modo, as heteroramnanas sulfatadas de baixa massa molecular com grupos sulfato em posições adequadas, como em OX-6Sc podem desempenhar atividade citotóxica em células U87MG equivalentes aos polímeros com massa molecular elevada e com menor grau de sulfatação, como em OX-6 (26% de sulfato).

Ainda em relação à atividade citotóxica em células U87MG, a menor atividade da fração OX-6Sb (34% grupos sulfato) pode estar relacionada com a sua menor massa molecular (109 kDa) em relação à OX-6Sc, bem como a presença de grupos em posições desfavoráveis para o desempenho desta atividade. A fração OX-6Sb é constituída qualitativamente pelos mesmos tipos de unidades de ramnose

sulfatadas presentes na fração OX-6Sc. No entanto OX-6Sb apresenta um teor significativamente menor de unidades de ramnose 2-ligadas 3,4-sulfatadas e menos expressivo em termos de ramnose 3-ligadas 4-sulfatadas quando comparada a fração OX-6Sc. O menor teor de unidades dissulfatadas, juntamente com a menor massa molecular de OX-6Sb foi correlacionado com a baixa atividade desta fração.

O perfil de atividade citotóxica desempenhado pelas frações OX-6, OX-6S, OX-6Sb e OX-6Sc também foi diferenciado quando avaliados em células da linhagem U373MG. Para esta linhagem as frações que apresentaram atividade mais citotóxica foram OX-6S e OX-6Sc. A partir desses resultados pode ser considerado que a atividade do “pool” dos produtos de degradação controlada de Smith (OX-6S) possa ser decorrente, pelo menos em parte da presença majoritária de OX-6Sc, a qual representa 51% da fração OX-6S.

Deste modo, tanto os polissacarídeos sulfatados de *G. oxysperma* quanto os produtos de degradação controlada de Smith são moléculas promissoras para estudos estruturais futuros de atividade antitumoral em células de glioma humano, visto a potente atividade citotóxica nas duas linhagens avaliadas (U373MG e U87MG). Destaca-se ainda, que há indicações de que OX-6Sc, bem como as outras moléculas polissacarídicas investigadas atuem na inibição da proliferação celular das linhagens celulares utilizadas, sem, no entanto ocasionar sua morte celular.

Portanto, um equilíbrio entre massa molecular, posicionamento específico dos grupos sulfato, e provavelmente a distribuição destes grupos ao longo do polímero, foram fatores decisivos para o desempenho da atividade citotóxica em células de glioma das linhagens U373MG e U87MG investigadas no presente trabalho.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através de análises químicas e espectroscópicas permitem concluir que a clorófito *G. oxysperma* sintetiza heteroramnanas altamente sulfatadas.

Através da metodologia de degradação controlada de Smith foi possível obter polissacarídeos com menor massa molecular (OX-6S) e maior grau de sulfatação em relação às heteroramnanas sulfatadas de origem. A metodologia de cromatografia de troca iônica foi eficaz no fracionamento de OX-6S gerando duas frações principais OX-6Sb e OX-6Sc.

Através de análises químicas e espectroscópicas as estruturas das frações OX-6Sb e OX-6Sc foram determinadas. As duas frações são similares em relação a composição monossacarídica, sendo constituídas principalmente por ramnose (93 – 95 mol%). Os produtos de degradação controlada de Smith OX-6Sb e OX-6Sc, além de apresentarem diferentes massas moleculares (109 e 251 kDa, respectivamente) e teor de grupos sulfato (34 e 41%, respectivamente) se diferenciam quanto ao posicionamento destes substituintes. As unidades de ramnose 3-ligadas não substituídas, 2-sulfatadas, 4-sulfatadas e 2,4-sulfatadas estão na proporção de 0,9:1,0:0,7:0,2 para OX-6Sb e 0,4:0,7:1,0:0,2 para OX-6Sc. Já as unidades de ramnose 2-ligadas não substituídas, 4-sulfatadas e 3,4-sulfatadas estão na proporção de 0,3:1,0:0,3 para OX-6Sb e 0,2:1,0:1,0 para OX-6Sc. Assim, em termos estruturais, a fração OX-6Sc se diferencia principalmente da fração OX-6Sb por ser constituída por maiores percentagens de ramnose 2-ligada 3,4-sulfatadas, bem como unidade de ramnose 3-ligadas 4-sulfatadas.

Os polissacarídeos de *G. oxysperma* apresentaram atividade antitumoral significativa em células tumorais de glioma humano. Para a linhagem U373MG as frações mais citotóxicas foram OX-6S e OX-6Sc. Para a linhagem U87MG as frações mais eficazes na redução da viabilidade celular foram a fração bruta (OX-6) e a fração OX-6Sc. Em ambas as linhagens a concentração mais citotóxica foi de 1000 µg/mL.

As frações OX-6Sb e OX-6Sc apresentaram efeitos citotóxicos diferentes, sendo a fração OX-6Sc mais eficaz na redução da viabilidade celular. A maior atividade de OX-6Sc foi correlacionada com um maior teor de unidades de ramnose 3-ligadas 4-sulfatadas e dissulfatadas (2-ligada 3,4-sulfatadas), além da massa molecular e grau de sulfatação.

A linhagem U87MG apesar de ser mais maligna que a U373MG, demonstrou ser mais sensível aos diferentes tipos de polissacarídeos, apresentando redução significativa na viabilidade celular a partir do tempo de incubação de 48 horas.

As heteroramnanas de *G. oxysperma* e seus produtos de degradação controlada de Smith apresentaram atividade antitumoral promissora em linhagens celulares de glioma humano. Estudos adicionais são necessários a fim de estabelecer os mecanismos de ação desses polissacarídeos.

REFERÊNCIAS

ABTA – American Brain Tumor Association. Disponível em: <[http://www.abta.org/Tumor & Treatment Info/Gliomas/230](http://www.abta.org/Tumor_&TreatmentInfo/Gliomas/230)>. Acesso em 10/09/2010.

AISA, Y.; MIYAKAWA, Y.; NAKAZATO, T.; SHIBATA, H.; SAITO, K.; IKEDA, Y.; KIZAKI, M. Fucoïdan Induces Apoptosis of Human HS-Sultan Cells Accompanied by Activation of Caspase-3 and Down-Regulation of ERK Pathways. **American Journal of Hematology**, v. 78, p. 7–14, 2005.

ANDERSON, M. A.; STONE, B. A. A radiochemical approach to the determination of carboxylic acid groups in polysaccharides. **Carbohydr. Polym.**, v. 5, p. 115-129, 1985.

AQUINO, R. S; LANDEIRA-FERNANDEZ, A. M.; VALENTE, A. P.; ANDRADE, L. R.; MOURÃO, P. A. S. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. **Glycobiology**, v.15, p.11–20, 2005.

ATHUKORALA, Y.; AHN, G. N.; JEE, Y-H.; KIM, G-Y.; KIM, S-H; HA, J-H.; KANG, J-S.; LEE, K-W.; JEON, Y-J. Antiproliferative activity of sulfated polysaccharide isolated from an enzymatic digest of *Ecklonia cava* on the U-937 cell line. **J Appl Phycol**, v. 21, p. 307–314, 2009.

BACKINOWSKY, L. V.; BALAN, M. F.; SHASHKOV, A. S.; KOCHETKOV, N. K. Synthesis and ¹³C-N.M.R. spectra of β-L-rhamnopyranosides. **Carbohydr. Res.**, v. 84, p. 225-235, 1980.

BeMILLER, J. N. Acid-catalyzed hydrolysis of glycosides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 22, p. 25-108, 1967.

BIERMANN, C. J.; MCGINNIS, G. D. **Analyses of carbohydrates by GLC and MS**. CRC Press. 1990. 291 p.

CARVALHO, L. R. de; ROQUE, N. F. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. **Química nova**, v. 23, n. 6, 2000.

CÁSSARO, C. M. F.; DIETRICH, C. P. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 7, p. 2254-2261, 1977.

CASSOLATO, J. E. F. **Determinação da estrutura química e atividade biológica de heteroramnanas sulfatadas obtidas de macroalgas verdes (Ulvaes - Chlorophyta)**. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CASSOLATO, J. E. F.; NOSEDA, M. D.; PUJOL, C. A.; PELLIZZARI, F. M.; DAMONTE, E. B.; DUARTE, M. E. R. Chemical structure and antiviral activity of the sulfated heterorhamnan isolated from the green seaweed *Gayralia oxysperma*. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 3085–3095, 2008.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, v. 131, p. 209-217, 1984.

CORRÊA, J. B. C. **Métodos químicos para a determinação de estrutura de polissacarídeos**. 1971. 62 p. Datilografado.

COSTA, L. S.; FIDELIS, G. P.; CORDEIRO, S. L.; OLIVEIRA, R. M.; SABRY, D. A.; CÂMARA, R. B. G.; NOBRE, L. T. D. B.; COSTA, M. S. S. P.; ALMEIDA-LIMA, J.; FARIAS, E. H. C.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. O. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 64, p. 21-28, 2010.

DAIS, P.; PERLIN, A. S. High-Field, ^{13}C -N.M.R. Spectroscopy of β -d-glucans, amylopectin, and glycogen. **Carbohydrate Research**, v. 100, p. 103-116, 1982.

DAMONTE, E. B.; MATULEWICZ, M. C.; CEREZO, A. S. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. **Curr. Med. Chem.**, v. 11, p. 2399-2419, 2004.

DEMUTH, T.; BERENS, M. E. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion, **Journal of Neuro-Oncology**, v. 70, p. 217–228, 2004.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the sulphate ester of sulphated polysaccharide. **Biochem. J.**, v. 84, p. 106-110, 1962.

DREYFUSS, J. L.; REGATIERI, C. V.; JARROUGE, T. R.; CAVALHEIRO, R. P.; SAMPAIO, L. O.; NADER, H. B. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, p.409-429, 2009.

DUARTE, M. E. R.; CARDOSO, M. A.; NOSEDA, M. D.; CEREZO, A. S. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Carbohydrate Research**, v. 333, p. 281-293, 2001a.

DUARTE, M. E. R.; CAUDURO, J. P.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. D.; GONÇALVES, A. G.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; CEREZO, A. S. The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 335-347, 2004.

DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; CARDOSO, M. A.; TULIO, S.; CEREZO, A. S. The structure of a galactan sulfate from the red seaweed *Bostrychia montagnei*. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1137-1144, 2002.

DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. D.; TULIO, S.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication *in vitro*. **Phytomedicine**, v. 8, n.1, p. 53-58, 2001b.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Anal. Biochem.**, v. 197, p. 157-162, 1991.

FREITAS, R. A. **Estrutura e interações entre galactoxiloglucanas e amidos**. 143f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

FURNEAUX, R. H.; STEVENSON, T. T. The xylogalactan sulfate from *Chondria macrocarpa* (Ceramiales, Rhodophyta). **Hydrobiologia**, v. 204/205, p. 615-620, 1990.

GOLDSTEIN, I. J.; HAY, G. W.; LEWIS, B. A.; SMITH, F. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Eds.). **Methods Carbohydr. Chem. Academic Press**, New York, v. 5, p. 361-369, 1965.

HAYAKAWA, Y.; HAYASHI, T.; LEE, J.-B.; SRISOMPORN, P.; MAEDA, M.; OZAWA, T.; SAKURAGAWA, N. Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides isolated from green algae. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1543, p. 86-94, 2000.

IMAMURA, T.; MITSUI, Y. Heparan Sulfate and Heparin as a Potentiator or a Suppressor of Growth of Normal and Transformed Vascular Endothelial Cells. **Experimental Cell Research**, v. 172, p. 92-100, 1987.

ITO, K.; HORI, K. Seaweed: chemical composition and potential food uses. **Food Reviews International**, v. 05, p. 101-144, 1989.

JANSSON, P.; KENNE, L.; LIEDRGREN, H.; LINDBERG, B.; JÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Chem. Commun.**, v. 8, p. 1-71, 1976.

KJELLÉN, M.; LINDAHL, U. Proteoglycans: Structures and interactions. **Annual Review Biochemistry**, v.60, p.443-475, 1991.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R. S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of matrix polysaccharides. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.**, v. 26, p. 259-315, 1988.

KNIREL, Y. A.; OVOD, V. V.; ZDOROVENKO, G. M.; GVOZDYAK, R. I.; KROHN, K. J. Structure of the O-polysaccharide and immunochemical relationships between the lipopolysaccharides of *Pseudomonas syringae* pathovar tomato and pathovar maculicola. **Eur. J. Biochem.**, v. 258, p. 657-661, 1998a.

KNIREL, Y. A.; OVOD, V. V.; PARAMONOV, N. A.; KROHN, K. J. Structural heterogeneity in the O-polysaccharide of *Pseudomonas syringae* pv. coriandricola GSPB 2028 (NCPBP 3780, W-43). **Eur. J. Biochem.**, v. 258, p. 716-721, 1998b.

KOYANAGI, S.; TANIGAWA, N.; NAKAGAWA, H.; SOEDA, S.; SHIMENO, H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 173-179, 2003.

LAHAYE, M.; BRUNEL, M.; BONNIN, E. Fine chemical structure analysis of oligosaccharides produced by an ulvan-lyase degradation of the water-soluble cell-wall polysaccharides from *Ulva* sp. (Ulvales, Chlorophyta). **Carbohydr. Res.**, v. 304, p. 325-333, 1997.

LEE, J. B.; HAYASHI, K.; MAEDA, M.; HAYASHI, T. Antiherpetic activities of sulfated polysaccharides from green algae. **Planta Med**, v. 70, p. 813-817, 2004.

LEVITAN, I. B.; KACZMAREK, L. K. Form e function in cells of the brain. In: **The Neuron**. 3 ed. New York: Oxford University Press, 2002, p. 25-46.

LEWIS, L. A.; McCOURT, R. M. Green algae and the origin of land plants. **American Journal of Botany**, v. 91, p. 1535-1556, 2004.

LIPKIND, G. M.; SHASHKOV, A. S.; KNIREL, Y. A.; VINOGRADOV, E. V.; KOCHETKOV, N. K. A computer-assisted structural analysis of regular polysaccharides on the basis of ^{13}C -N.M.R. data. **Carbohydr. Res.**, v. 175, p. 59-75, 1988.

LIU, Y.; LIU, C.; TAN, H.; ZHAO, T.; CAO, J.; WANG, F. Sulfation of a polysaccharide obtained from *Phellinus ribis* and potential biological activities of the sulfated derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 370–375, 2009.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J. FARR, A. L.; RANDALL, K. L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAGASAWA, K.; INOUE, Y.; TOKUYASU, T. An improved method for the preparation of the chondroitin by solvolytic desulfation of chondroitin sulfates. **J. Biol. Chem.**, v. 86, p. 1323-1327, 1979.

NODA, H.; AMANO, H.; ARASHIMA, K.; NISIZAWA, K. Antitumor activity of marine algae. **Hydrobiologia**, v. 204/205, p. 577-584, 1990.

OLIVEIRA, E. C.; HORTA, P. A.; AMÂNCIO, C. E.; SANT'ANNA, C. L. Algas e angiospermas marinhas bênticas do litoral brasileiro: diversidade, exploração e conservação. 1999. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/brnd/round6/guias/PERFURACAO/PERFURACAO_R6/refere/plantas_marinhas.pdf> Acesso em 07/01/10.

ORTIZ, J.; ROMERO, N.; ROBERT, P.; ARAYA, J.; LOPEZ-HERNÁNDEZ, J.; BOZZO, C.; NAVARRETE, E.; OSORIO, A.; RIOS, A. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. **Food Chem.**, v. 99, p. 98-104, 2006.

OVOD, V. V.; ZDOROVENKO, E. L.; SHASHKOV, A. S.; KOCHAROVA, N. A.; KNIREL, Y. A. Structural diversity of O-polysaccharide and serological classification of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* and other strains of genomospecies 4. **Microbiology**, v. 73, p. 666-677, 2004.

PAINTER, T. J. Algal polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. **The polysaccharides**. New York: Academic Press, 1983. p.195-285.

PARK, H. Y.; LIM, C. W.; KIM, Y. K.; YOON, H. D.; LEE, K. J. Immunostimulating and anticancer activities of hot water extract from *Capsosiphon fulvescens*. **J Korean Soc Appl Biol Chem.**, v. 49, p. 343–348, 2006.

PARISH, C. R.; FREEMAN, C.; BROWN, K. J.; FRANCIS, D. J.; COWDEN, W. B. Identification of Sulfated Oligosaccharide-based Inhibitors of Tumor Growth and Metastasis Using Novel in Vitro Assays for Angiogenesis and Heparanase Activity. **Cancer research**, v. 59, p.3433–3441, 1999.

PELLIZZARI, F. M.; ABSHER, T.; YOKOYA, N. S.; OLIVEIRA, E. C. Cultivation of the edible green seaweed *Gayralia* (Chlorophyta) in southern Brazil. **J. Appl. Phycol.**, v. 19, p. 63-69, 2007.

PELLIZZARI, F. M.; ABSHER, T.; YOKOYA, N. S.; OLIVEIRA, E. C. Life-history, thallus ontogeny, and the effects of temperature, irradiance and salinity on growth of the edible green seaweed *Gayralia* spp. (Chlorophyta) from southern Brazil. **J. Appl. Phycol.**, v. 20, p. 75-82, 2008.

PELLIZZARI, F. M.; OLIVEIRA, E. C.; YOKOYA, N. S. Coverage and recruitment of the edible green macroalga *Monostroma oxyspermum* in Paranaguá Bay in southeastern Brazil. **J. Coast. Res.**, v. 39 (special issue), 2004.

PENGZHAN, Y.; NING, L.; XIGUANG, L.; GEFEI, Z.; QUANBIN, Z.; PENGCHENG, L. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Pharmacological Research**, v. 48, p. 543–549, 2003.

QI, H.; ZHANG, Q.; ZHAO, T.; CHEN, R.; ZHANG, H.; NIU, X.; LI, Z. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, p. 195–199, 2005.

RAY, B. Polysaccharides from *Enteromorpha compressa*: isolation, purification and structural features. **Carbohydr. Polym.**, v. 66, p. 408-416, 2006.

RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; ALENCAR, D. B. DE; SAMPAIO, A. H. FARIAS, W. R. L. Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, p. 224-231, 2009.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards from GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 731-739, 2005.

SENCHEKOV, S. N.; SHASHKOV, A. S.; LAUX, P.; KNIREL, Y. A.; RUDOLPH, K. The O-chain polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Xanthomonas campestris* pv. *Begoniae* GSPB 525 is a partially L-xylosylated L-rhamnan. **Carbohydr. Res.**, v. 319, p. 148-153, 1999.

SHANMUGAM, M; MODY, K. H. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. **Current science**, v. 79, 2000.

SMIT, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, p. 245-262, 2004.

STEVAN, F. R.; OLIVEIRA, M. B. M.; BUCCHI, D. F.; NOSEDA, M. D.; IACOMINI, M.; DUARTE, M. E. R. Cytotoxic effects against HeLa cells of polysaccharides from seaweeds. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 33, p. 477-484, 2001.

STEVENSON, T. T.; FURNEAUX, R. H. Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. **Carbohydr. Res.**, v. 210, p. 277-298, 1991.

TALARICO, L. B.; ZIBETTI, R. G. M.; FARIA, P. C. S.; SCOLARO, L. A.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, p. 63-71, 2004.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuranans to monossaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochemistry**, v. 11, p. 1383-1388, 1972.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. do C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Quim. Nova**, v. 27, p. 139-145, 2004.

XUE, C. H.; FANG, Y.; LIN, H.; CHEN, L.; LI, Z. J.; DENG, D.; LU, C. X. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, p. 67–70, 2001.

WANG, L.; LI, X. X.; CHEN, Z. H. Sulfated modification of the polysaccharides obtained from defatted rice bran and their antitumor activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, p. 211–214, 2009.

YE, H.; WANG, K.; ZHOU, C.; LIU, J.; ZENG, X. Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. **Food Chemistry**, v. 111, p. 428–432, 2008.

YUANA, H.; SONGA, J.; LI, X.; LI, N.; DAI, J. Immunomodulation and antitumor activity of k-carrageenan oligosaccharides. **Cancer Letters**, v. 243, p. 228–234, 2006.

YUAN, H.; SONG, J. Preparation, structural characterization and in vitro antitumor activity of kappa-carrageenan oligosaccharide fraction from *Kappaphycus striatum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, p. 7–13, 2005.

ZHANG, H.J. MAO, W. J.; FANG, F.; LI, H.Y.; SUN, H. H.; CHEN, Y.; QI, X. H. Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*, **Carbohydrate polymers**, v.71, p.428-434, 2008.

ZHOU, G.; SUN, Y.; XIN, H.; ZHANG,Y.; LI, Z.; XU, Z. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacological Research**, v. 50, p. 47–53, 2004.

ZUBIA, M.; FABRE, M. S.; KERJEAN, V.; LANN, K. L.; STIGER-POUVREAU, V.; FAUCHON, M.; DESLANDES, E. Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. **Food Chemistry**, v. 116, p. 693–701, 2009.